



CROMATOGRAFIA



Cromatografia

Questo testo proviene dal sito
<https://it.wikibooks.org/wiki/Cromatografia>
ed è stato scritto collettivamente dagli utenti di tale sito

Principale autrice:
Giuli2797

Questa versione del libro è aggiornata al
3 settembre 2022

In copertina:
Presso la ARS Natural Products Utilization Research Unit in Oxford, MS., la scienziata Susan Watson estrae i pigmenti da un campione vegetale che verrà analizzato dal fisiologo Franck Dayan utilizzando un sistema HPLC. *Autore:* USDA; *licenza:* Creative Commons Attribution 2.0 Generic; *fonte:* https://commons.wikimedia.org/wiki/File:HPLC_extraction_and_use.jpg

Wikibooks non dà garanzie sulla validità dei suoi contenuti. Per i dettagli vedi:
https://it.wikibooks.org/wiki/Wikibooks:General_disclaimer

Quest'opera è soggetta alla licenza Creative Commons Attribuzione-Condividi allo stesso modo 3.0 Unported. Per leggere una copia della licenza visita il sito:
<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/deed.it>

Indice

Introduzione	vii
Cromatografia	vii
Cromatogramma	x
Modello a piatti teorici	xi
Teoria dell'allargamento di banda ed equazione di Van Deemter	xiv
Classificazione delle tecniche cromatografiche	xvi
Esercizi	xvii
Soluzioni	xviii
1 Cromatografia liquida	1
1.1 Caratteristiche generali	1
1.2 Pompe	2
1.3 Iniettori	4
1.4 Colonne	4
1.5 Rivelatori	10
1.6 Esempio di applicazione	12
1.7 Esercizi	14
1.8 Soluzioni	14
2 Gascromatografia	17
2.1 Caratteristiche generali	17
2.2 Gas carrier	18
2.3 Controllo del flusso	19
2.4 Iniettore	19
2.5 Colonna	21
2.6 Rivelatore	24
2.7 Esempio di applicazione	29
3 Spettrometria di massa e accoppiamento GC-MS	31
3.1 Caratteristiche generali	31
3.2 Sistema di introduzione del campione	32
3.3 Sorgente ionica	32
3.4 Analizzatore	33
3.5 Rivelatore	36
3.6 Accoppiamento GC-MS	37
3.7 Esempio di applicazione	40

4 Cromatografia a fluido supercritico	43
4.1 Caratteristiche generali	43
4.2 Strumentazione	44
4.3 Fase mobile	45
4.4 Applicazioni	46
Bibliografia	47

In questo libro verranno illustrate le principali tecniche cromatografiche. Partendo dalla cromatografia in generale verranno presentati i punti cardine di questa famiglia di tecniche per poi concentrarsi una ad una su ciascuna di queste.

Ogni tecnica sarà presentata insieme a delle applicazioni pratiche e sarà corredata disegni che facilitino la comprensione del lettore. Al termine di ogni capitolo saranno presenti domande ed esercizi utili a valutare la comprensione degli argomenti.

Introduzione

Con il termine cromatografia si intende una serie di metodi analitici in grado di separare, identificare e quantificare i diversi componenti presenti in miscele di analiti, talvolta anche molto complesse. In particolare, la IUPAC definisce la cromatografia come «un metodo fisico separativo in cui i componenti da separare sono distribuiti tra due fasi, una delle quali è fissa (fase stazionaria), mentre l'altra (la fase mobile) si muove in una direzione definita».¹

I metodi cromatografici sfruttano gli equilibri di distribuzione delle varie sostanze tra due fasi diverse e immiscibili tra loro: la fase mobile e la fase stazionaria.

Cromatografia

La cromatografia vede una sua prima applicazione nel 1906 quando il botanico russo Mikhail Semyonovich Tsvet utilizzò questa tecnica per separare i pigmenti naturali contenuti in estratti vegetali.

Egli prelevò delle foglie verdi ed estrasse i pigmenti in esse contenute con etere di petrolio, depose l'estratto in testa ad una colonna di vetro impaccata con carbonato di calcio ed eluì in modo continuo con del solfuro di carbonio. Quello che egli poté osservare è che, procedendo con l'eluizione, i vari pigmenti presenti nella miscela si separavano in bande colorate contenenti clorofilla A e B, carotene e xantofilla che procedevano con diverse velocità verso il fondo della colonna.

Essendo tutte le specie oggetto di analisi colorate non ebbe necessità di utilizzare strumenti per visualizzarle.

La parola cromatografia deriva infatti dal greco χρώμα (“colore”) e γραφή (“scrittura”), letteralmente “scrittura con il colore”, anche se grazie ai rivelatori che vengono usati attualmente non è più necessario che le sostanze da separare siano colorate.

I metodi cromatografici si possono distinguere in due classi:

- su colonna - la fase stazionaria è solitamente contenuta in una colonna in cui la fase mobile viene fatta passare per gravità o per applicazione di una pressione;

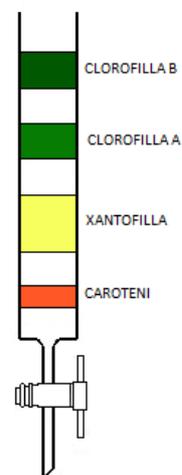


Fig. 1: Colonna cromatografica in cui si evidenzia la separazione delle sostanze eluite

- planari - la fase stazionaria costituita da un materiale adsorbente viene fatta aderire come strato sottile su un supporto solido generalmente planare, come ad esempio una lastrina di vetro. In questo caso la fase mobile non si muove per gravità come nel caso precedente, ma risalendo lungo la lastrina per capillarità.

In questo libro ci focalizzeremo sulla cromatografia su colonna. In un'analisi cromatografica il campione da analizzare viene caricato in testa alla colonna ed eluito con una fase mobile detta eluente; il processo attraverso il quale il campione viene trasportato lungo la colonna dal flusso della fase mobile è detto eluizione.

Fase stazionaria: è il materiale che costituisce il riempimento della colonna ed è la fase con la quale l'analita instaura le interazioni che lo trattengono durante l'eluizione. È solitamente composta da particelle sferiche di piccole dimensioni dell'ordine di pochi micron: questo perché, dal momento che i processi sfruttati da questa tecnica sono processi di interfaccia, è molto utile avere la maggior superficie disponibile per unità di volume per massimizzare l'efficacia del processo.

Fase mobile: è la fase fluida che si muove attraverso il riempimento della colonna e che garantisce la mobilità degli analiti. A seconda del tipo di fase mobile potremo avere a che fare con:

- cromatografia liquida - LC (*Liquid Chromatography*);
- gascromatografia - GC (*Gas Chromatography*);
- cromatografia con fluido supercritico - SFC (*Supercritical Fluid Chromatography*).

La separazione dei componenti di una miscela avviene a seguito delle interazioni chimico-fisiche che si instaurano fra le molecole da separare con la fase mobile e con la fase stazionaria, fasi che sono scelte affinché gli analiti presenti nella miscela da separare si distribuiscano tra le due fasi: i componenti più affini alla fase stazionaria verranno trattiene maggiormente da questa e si sposteranno più lentamente, mentre i componenti più affini alla fase mobile, trattiene meno saldamente, si sposteranno più velocemente lungo la colonna.

La separazione dei componenti avviene in virtù del fatto che ogni sostanza ha una distribuzione caratteristica tra le due fasi, che è espressa attraverso il coefficiente di distribuzione K_d :²

$$K_d = \frac{C_s}{C_m}$$

dove C: $K_d = \frac{C_s}{C_m}$ e C_m sono la concentrazione della sostanza rispettivamente nella fase stazionaria e nella fase mobile. In particolare:

- $K_d = 1 \rightarrow$; sostanza ugualmente ripartita nelle 2 fasi;
- $K_d < 1 \rightarrow$; sostanza ripartita preferenzialmente nella fase mobile;
- $K_d > 1 \rightarrow$; sostanza ripartita preferenzialmente nella fase stazionaria.

Un altro parametro importante è il fattore di capacità k' che descrive la migrazione dei soluti lungo la colonna ed è definito come:

$$k' = K_d \frac{V_S}{V_M}$$

dove V_S è il volume della fase stazionaria e V_M il volume della fase mobile.

Non è consigliabile avere valori di k' minori a 1 per evitare che il picco dell'analita si vada a sovrapporre con quello del solvente, ma neanche valori di $k' >$ a 15-20 per non andare a tempi di ritenzione eccessivamente lunghi a cui corrispondono picchi troppo slargati (vedi capitolo su equazione di Van Deemter).

k' assume valori diversi a seconda che si tratti di una separazione analitica (1-8) oppure di scopi preparativi (4-12).

A seconda della tecnica cromatografica che si andrà ad utilizzare si dovrà giocare su aspetti differenti per migliorare questo parametro ovvero:

- temperatura ed impaccamento della colonna nel caso della GC;
- natura chimica della fase stazionaria e della fase mobile nel caso della LC.

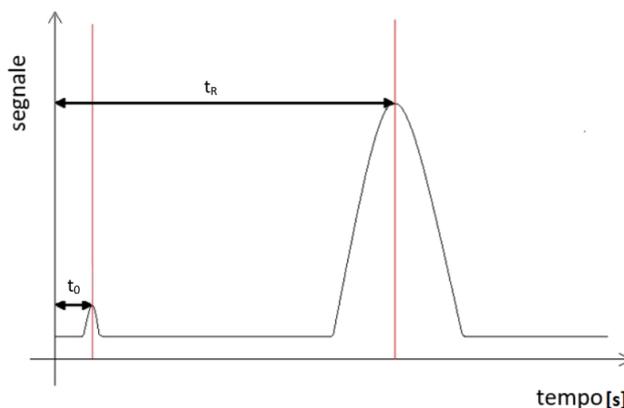


Fig. 2: Tempo morto

Quando due analiti restituiscono picchi molto vicini tra loro è molto importante conoscere il fattore di selettività α che descrive la capacità di una colonna di separare due analiti. Questa è definita come:

$$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1}$$

con α sempre maggiore o uguale a 1 (la specie 2 indica la specie maggiormente trattenuta, mantenendo costanti il volume sia della fase stazionaria che della fase mobile).

Selettività: è la capacità del metodo cromatografico di distinguere due picchi vicini dovuti a due sostanze diverse eluite contigualmente³ presenti all'interno dello stesso campione ed è definito attraverso il coefficiente di selettività α .

$$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1}$$

con $1 < \alpha < 2$ (per $\alpha = 1$ infatti i picchi sono completamente sovrapposti). Andando ad osservare un generico cromatogramma si potrà dire che la separazione è selettiva se i picchi saranno ben distinti gli uni dagli altri e non si avrà sovrapposizione tra picchi contigui.

Efficienza: è la capacità del metodo cromatografico di eluire tutte le molecole dello stesso analita contemporaneamente. Andando ad osservare un generico cromatogramma si potrà dire che la separazione è efficiente se i picchi saranno molto stretti.

Affinché la risoluzione sia buona occorre che sia la selettività sia l'efficienza siano buone.

Per migliorare questo parametro si può andare ad intervenire su alcuni parametri sperimentali differenti a seconda che si abbia a che fare con cromatografia liquida o gascromatografia:

- HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) - si interviene sulla K di distribuzione lavorando a gradiente di solvente modificando nel corso dell'eluizione le caratteristiche dell'eluente, così da andare a modificare la ripartizione dell'analita nelle due fasi;
- GC - si agisce aumentando la temperatura in modo controllato al fine di favorire la volatilizzazione degli analiti e quindi l'eluizione di sostanze anche molto diverse tra loro.

Cromatogramma

Il cromatogramma è un grafico che riporta l'intensità del segnale dato dalle sostanze in funzione del tempo di analisi.

Il primo picco che si nota nel cromatogramma è solitamente molto piccolo e in corrispondenza di tempi di ritenzione molto brevi e corrisponde al tempo morto, ovvero il picco relativo all'eluizione del solo solvente. Seguiranno poi una serie di picchi di intensità differenti dati dalle altre sostanze presenti nel campione che verranno eluite con tempi differenti a seconda dell'affinità che queste avranno con la fase stazionaria: le sostanze che avranno minore affinità per la fase stazionaria saranno eluite per prime, e le successive, avendo affinità via via crescente con questa, verranno quindi eluite in tempi più lunghi.

Durante l'eluizione ci saranno particelle di analita rimaste disciolte nella fase stazionaria per tempi più o meno brevi rispetto alla media delle particelle della stessa specie, per cui arriveranno al rivelatore in tempi leggermente diversi: questo perché la distribuzione dell'analita non sarà costante punto a punto all'interno della colonna ma varierà secondo leggi statistiche. Per questo motivo il rivelatore restituirà un segnale sotto forma di picco gaussiano.

Dalla osservazione dei picchi presenti nel cromatogramma, si possono ricavare informazioni differenti:

- qualitative – si ricavano andando a confrontare i tempi di ritenzione osservati nel cromatogramma con i valori tabulati in modo da poter riconoscere la sostanza in esame;
- quantitative – date dal numero delle particelle di analita presenti che contribuiscono al segnale, ed è proporzionale all'area sottesa al picco.

La misura dell'area sottesa al picco viene eseguita con metodi di integrazione digitale, tuttavia questo metodo è comunque soggetto ad errore e nello specifico può essere affetto da:

- rumore di fondo – è il segnale rivelato dal rivelatore non dovuto all'analita.⁴ Se la linea di base è soggetta ad un alto rumore di fondo sarà difficile identificare il punto esatto in cui inizia il picco, il rapporto segnale/rumore è infatti elevato;
- mancata o non sufficiente risoluzione dei picchi – se nel cromatogramma sono presenti picchi molto vicini o addirittura sovrapposti, è molto difficile - se non impossibile - identificare le due singole aree. In questo caso la soluzione migliore consiste nel migliorare la separazione cromatografica in modo da avere picchi più stretti o comunque meglio risolti;
- deriva della linea di base – si verifica nel caso in cui la linea di base non sia rettilinea, ma ascendente o discendente, in questo caso bisogna tenerne conto e non fare l'integrazione considerandola orizzontale;
- asimmetria del picco – talvolta il segnale restituito non è una gaussiana perfetta. Questo si verifica nel caso in cui ad esempio la fase mobile venga trattata parzialmente dalla fase stazionaria e si abbia uno strascico del segnale: ne consegue quindi che il picco presenti una coda.

I vari picchi presenti nel cromatogramma devono essere il più stretti possibile, questo perché:

- un picco più stretto è più facilmente distinguibile e risente meno del rumore di fondo;

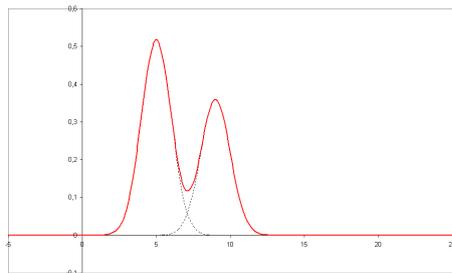


Fig. 3: Picchi non risolti

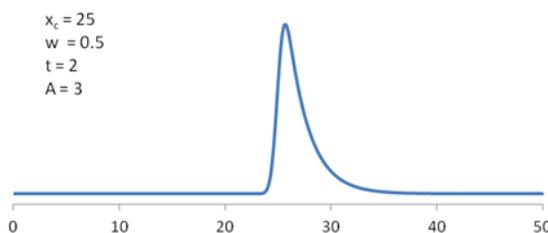


Fig. 4: Picco asimmetrico

- picchi stretti rendono meno probabile l'eventuale sovrapposizione con picchi vicini di sostanze con tempi di ritenzione simili, cosa che renderebbe difficile la corretta lettura del cromatogramma.

Si può quindi affermare che, tanto più stretto sarà il picco, tanto migliore sarà la sensibilità dell'analisi.

Modello a piatti teorici

Il modello a piatti teorici è un modello ormai superato per la descrizione del funzionamento della colonna cromatografica, tuttavia ha ancora un'utilità per spiegare alcuni concetti importanti.

Secondo questo modello il sistema cromatografico è rappresentato da una colonna costituita da una serie di strati sottili chiamati piatti teorici che costituiscono l'elemento fondamentale della separazione cromatografica: questi consentono infatti di realizzare un equilibrio reversibile di ripartizione di un componente fra le fasi. Aspetto da tenere a mente è che questi microelementi in cui viene suddivisa la colonna sono puramente immaginari, non esistono quindi fisicamente ma sono solo una semplificazione.

L'analita, una volta raggiunto l'equilibrio su un piatto, si sposta lungo la colonna al piatto successivo poiché trasportato dal flusso della fase mobile.⁵ Dal momento che in cromatografia si ha una sequenza continua di stati di equilibrio e non vi è possibilità di realizzare una singola separazione, N (numero dei piatti teorici) ha un significato puramente matematico.

Più elevato è il numero di piatti teorici e migliore è la capacità di separazione della colonna e quindi migliore è la sua efficienza. N è inoltre proporzionale alla lunghezza della colonna.

Si immagini di condurre una separazione cromatografica di una miscela di due sostanze (a e b) aventi diverso coefficiente di ripartizione con una colonna contenente una fase stazionaria solida granulare e usando come fase mobile un liquido:

- $K_a = \frac{C_{a,mob}}{C_{a,staz}} = 1 \rightarrow$; identica ripartizione tra le due fasi;
- $K_b = \frac{C_{b,mob}}{C_{b,staz}} = 0,33 \rightarrow$; predilige la fase stazionaria.

Si immagini di partire con lo stesso numero di molecole di ogni sostanza e di caricare la miscela il testa alla colonna a un tempo $t=0$ ed eseguire l'eluizione con una fase mobile adeguata: le due sostanze verranno eluite in tempi diversi perché diverse sono le interazioni che queste hanno con la fase stazionaria (diversi sono infatti i coefficienti di ripartizione).

Partendo da 256 molecole di entrambe le sostanze al primo equilibramento si avranno:

- per la sostanza A 128 molecole nella fase mobile e 128 nella fase stazionaria;
 - per la sostanza B 64 molecole nella fase mobile e 192 nella fase stazionaria.
- Al piatto successivo, terminato il primo equilibramento, arriveranno solo 128 molecole di A e 64 di B, per cui la loro ripartizione nel secondo piatto sarà:
- per la sostanza A 64 molecole nella fase mobile e 64 nella fase stazionaria;
 - per la sostanza B 16 molecole nella fase mobile e 48 in quella stazionaria.

Il processo separativo prosegue in modo analogo lungo tutta la colonna. Dopo un certo numero di processi di ripartizione si potrà osservare una certa differenza nella migrazione delle due sostanze a vantaggio di A: al ventesimo equilibramento la sostanza A avrà raggiunto il diciottesimo piatto mentre B sarà ancora all'undicesimo.

Prolungando a sufficienza il processo separativo e aumentando di conseguenza il numero di piatti teorici, si ottiene la risoluzione dei due picchi a cui corrisponde l'uscita dalla colonna delle due sostanze in momenti differenti. Andando a riportare su un grafico il numero di molecole rispetto al numero di piatti teorici otteniamo:

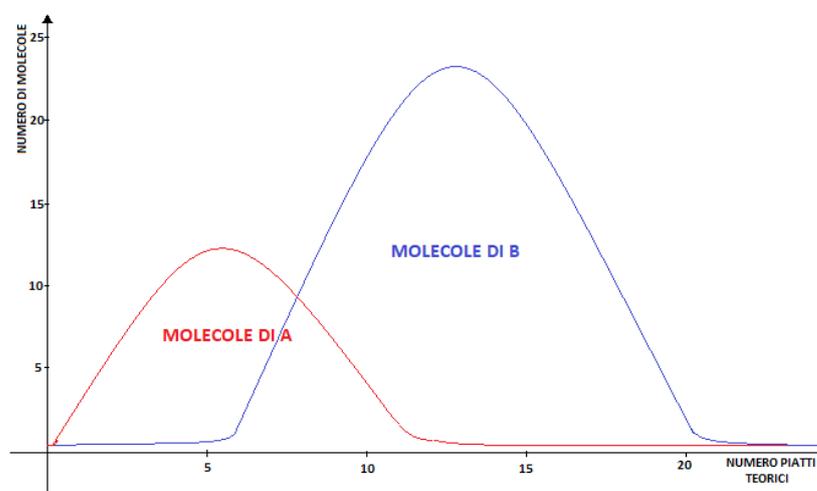


Fig. 5: Separazione di due sostanze - modello a piatti teorici

L'integrale della curva indica il numero totale di molecole, e il picco relativo alla sostanza A sarà spostato rispetto al picco relativo alla sostanza B. Il modello spiega in modo efficace la forma gaussiana dei picchi e le differenze nelle velocità di migrazione dei soluti, ma non l'allargamento della banda di eluizione in funzione della natura del solvente utilizzato e della velocità del flusso della fase mobile. Il motivo è che questo modello presuppone che si riesca sempre ad instaurare l'equilibrio tra le due fasi all'interno di ogni singolo piatto teorico: questo però non avviene perché la colonna cromatografica è un sistema dinamico e non di equilibrio. Affinché si possa instaurare l'equilibrio bisognerebbe fermare la fase mobile in corrispondenza di ogni piatto teorico, cosa che non avviene durante il processo di eluizione.

Nonostante questo modello sia ormai superato i concetti di numero dei piatti teorici (N) e di altezza del piatto teorico ($HETP$ - *Height Equivalent to Theoretical Plate*) sono ancora usati in cromatografia per valutare l'efficienza di un processo cromatografico:

$$HETP_{piatto} = \frac{L_{colonna}}{N_{piatti}}$$

Da questa espressione si evince che per avere l'altezza del piatto teorico minore possibile sarà necessario avere il maggior numero di piatti teorici a parità di lunghez-

za della colonna. Il numero dei piatti teorici può essere calcolato sperimentalmente come:

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W} \right)^2$$

dove t_R è il tempo di ritenzione di un picco e w la larghezza del picco alla sua base.

Da questa relazione si ricava che il numero di piatti teorici dipende non solo dal tipo di colonna, ma anche dall'analisi considerato, questo perché, a parità di colonna, sostanze diverse avranno diversi tempi di ritenzione e i picchi avranno ampiezze diverse.

Giunti a questo punto risulta necessario introdurre un nuovo concetto fondamentale in cromatografia: la risoluzione.

Si definisce **risoluzione** un parametro analitico che misura la capacità di una colonna di distinguere due picchi contigui.

$$R = \frac{2\Delta t}{W_1 + W_2}$$

e i due picchi in esame hanno area simile vale l'approssimazione per cui:

$$R = \frac{\Delta t}{W}$$

a risoluzione risente degli effetti dei fattori di ritenzione e di selettività.

Questo aspetto può essere definito tramite la seguente equazione:⁶

$$R_S = \left(\frac{\sqrt{N}}{4} \right) \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k'_2}{1 + k'_2} \right)$$

dove k'_2 è il fattore di ritenzione della specie che si muove più lentamente ed è definito come $k' = K_d \frac{V_S}{V_M} = \frac{t_R - t_0}{t_0}$, mentre α è il fattore di selettività.

Da questa formula si vede come la variazione del termine N incide poco sulla risoluzione finale essendo questo un termine in radice quadrata. Allo stesso tempo la risoluzione è direttamente proporzionale a k' : per valori di k' piccoli (nell'ordine di poche unità) anche una piccola variazione del valore incide largamente, ma per valori di k' elevati piccole variazioni di k' non comportano effetti importanti. Il valore che incide maggiormente sulla risoluzione è α ; tuttavia, è difficile prevedere l'effetto causato da una sua variazione, quindi si tende ad intervenire su questo parametro solo quando non è possibile ottenere un miglioramento significativo modificando k' e N .

Se si vuole migliorare k' si agisce sulla polarità del solvente: in questo modo tutti i picchi subiscono uno spostamento di uguale entità nella stessa direzione.

Se si va ad intervenire su α ogni picco subirà una variazione della sua posizione relativa, ognuno in maniera diversa. Per modificare α si può agire su diversi fattori, quali ad esempio la temperatura: alzando la temperatura infatti diminuiscono i tempi di ritenzione, i picchi si fanno più stretti e la loro posizione relativa cambia. La temperatura però non può essere alzata eccessivamente o si rischia di vaporizzare il solvente nella colonna creando vuoti e cavità che possono danneggiarla irrimediabilmente. In alternativa si può andare ad intervenire sul solvente aggiungendo tamponi, chelanti e modificatori organici.

L'equazione sopra citata può poi essere riarrangiata per ricavare il numero di piatti teorici necessari per avere la risoluzione desiderata:⁷

$$N = 16R_s^2 \left(\frac{\alpha}{\alpha - 1} \right)^2 \left(\frac{1 + k'_2}{k'_2} \right)^2$$

Per avere una separazione ottimale è necessario avere una buona risoluzione la quale dipende da selettività ed efficienza.

Teoria dell'allargamento di banda ed equazione di Van Deemter

Sperimentalmente si può notare che all'aumentare del tempo di ritenzione i picchi tendono ad allargarsi e in particolare che l'allargamento del picco è funzione del tempo che il soluto trascorre in colonna.

Questo fenomeno può essere spiegato attraverso diversi modelli tra cui ad esempio il modello di non equilibrio di Giddings secondo il quale il fenomeno dell'allargamento del picco è causato da fattori fisici e cinetici quali ad esempio la diversa velocità di migrazione delle molecole di analita nella colonna e non da differenze negli equilibri di distribuzione. Possiamo identificare quindi le cause di questo effetto in tre diversi fattori:

■ Percorsi multipli – quando le particelle di analita attraversano la colonna impaccata di fase stazionaria possono percorrere percorsi differenti a seconda delle vie rimaste libere al suo interno. Ne consegue quindi che dal punto di vista statistico non tutte le particelle percorreranno cammini identici ma, mentre alcune seguiranno percorsi leggermente più brevi, altre seguiranno percorsi più lunghi per cui arriveranno in fondo alla colonna in tempi leggermente differenti. Se le molecole di fase stazionaria sono molto fini questo effetto verrà minimizzato perché dal punto di vista statistico la lunghezza dei vari percorsi che una particella di soluto potrà percorrere saranno molto simili tra loro. Rendendo omogeneo il sistema infatti le deviazioni dal percorso medio saranno minimizzate.

$$A = 2\lambda d_P^8$$

con d_P = diametro delle particelle della fase stazionaria; λ = fattore di impaccamento. Sebbene per limitare questo effetto sia necessario usare una fase stazionaria con granulometria quanto più fine possibile, bisogna comunque tenere a mente le problematiche connesse a questo tipo di pratica: con il diminuire delle dimensioni delle particelle di fase stazionaria i percorsi che l'analita può percorrere saranno sempre più stretti e questo comporterà un impedimento nella fluidità del campione attraverso la colonna. Tanto più l'analita farà fatica a muoversi nella colonna e tanto più lunghi saranno i tempi di ritenzione: questo effetto va ovviamente evitato. È importante tenere a mente che questo effetto non dipende dalla velocità del flusso dell'eluente.

■ Diffusione longitudinale – dal momento che le particelle di analita si trovano in soluzione saranno soggette ad una migrazione spontanea dalle zone in cui la concentrazione di analita è maggiore verso quelle in cui tale concentrazione è minore. Il risultato di questo effetto si verificherà con l'allargamento del picco in uscita dal rivelatore. L'effetto causato dalla diffusione longitudinale si avrà non solo nel senso di scorrimento della fase mobile ma anche in quello opposto. Questo fenomeno è proporzionale al tempo di permanenza in colonna: tanto maggiore è il tempo di ritenzione e tanto maggiore è la diffusione dell'analita nel solvente, a cui consegue un maggiore slargamento del picco.

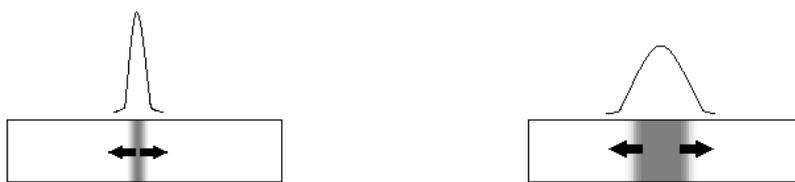


Fig. 6: Allargamento di banda - diffusione longitudinale

$$B = 2k_D D_M^9$$

dove k_D è il fattore di ostruzione ed indica la resistenza alla diffusione dovuta all'impaccamento; D_M invece è il coefficiente di diffusione dell'analita nella fase mobile, è una misura quantitativa di quanto velocemente le molecole di analita si muovono attraverso una matrice e dipende dal tipo di analita, temperatura, pressione e materiale costituente la matrice.¹⁰

Per cercare di limitare questo effetto può essere opportuno aumentare la velocità del flusso così da diminuire il tempo di permanenza in colonna dell'analita e quindi limitare il tempo a disposizione per la diffusione.

Questo fenomeno è più marcato in GC perché un gas rispetto ad un liquido ha un maggiore coefficiente di diffusione, ovvero le molecole di analita si riescono a muovere più velocemente nella fase mobile. Per questo motivo una possibile soluzione è quella di scegliere come eluente un solvente in cui l'analita sia poco mobile.

■ Diffusione di non equilibrio – definito anche resistenza al trasferimento di massa, è un effetto che si verifica durante il processo cromatografico ed è dovuto al fatto che le molecole di analita si trasferiscono continuamente dalla fase mobile a quella stazionaria e viceversa. Può capitare che la fase mobile, scorrendo continuamente lungo la colonna, allontani l'analita dalla fase stazionaria prima che questo abbia il tempo di raggiungere l'equilibrio di ripartizione tra le due fasi con il conseguente allargamento della banda.

$$C = \frac{8}{\pi^2} \frac{k}{(1+k)^2} \frac{d_f^2}{D_S} \quad 11$$

dove d_f è lo spessore del film della fase stazionaria liquida, mentre D_S è il coefficiente di diffusione del soluto nella fase stazionaria. Questo effetto sarà direttamente proporzionale alla velocità del flusso dell'eluente: tanto più lentamente avverrà l'eluizione, tanto più tempo avrà l'analita a disposizione per ripartirsi tra le fasi e tanto più si avvicinerà all'equilibrio di ripartizione.

Per minimizzare questo effetto si possono inoltre applicare altre accortezze quali l'utilizzo di una fase stazionaria ricoperta da un film che sia il più sottile possibile e contemporaneamente avere un coefficiente di diffusione dell'analita nelle due fasi quanto più elevato possibile. Una buona soluzione consiste quindi nell'utilizzare come eluente un solvente poco viscoso.

Tutti e tre questi fenomeni diffusivi concorrono nel definire l'altezza del piatto teorico di una colonna ed il loro effetto viene espresso dall'equazione di Van Deemter:

$$HETP = A + \frac{B}{u} + Cu$$

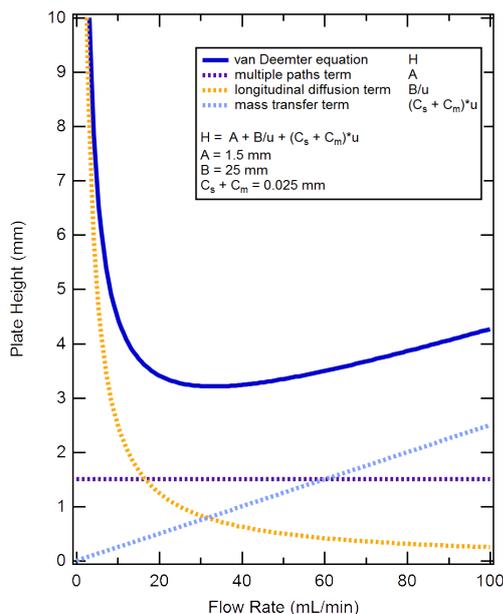


Fig. 7: Equazione di Van Deemter

con u = velocità lineare di flusso

A, B e C termini che rappresentano i tre fenomeni diffusivi visti precedentemente, nello specifico:

A = percorsi multipli

B = diffusione longitudinale

C = diffusione di non equilibrio

Dal momento che per avere una buona separazione cromatografica bisogna cercare di ridurre quanto più possibile l'altezza del piatto teorico, si dovrà cercare di rendere minima la somma dei tre fattori A B C. Questo può essere fatto ottimizzando parametri quali:¹²

- velocità del flusso della fase mobile - si deve giungere ad un compromesso tra la velocità richiesta dai parametri B e C (si ricorda infatti che il termine A è indipendente dalla velocità del flusso);
- diametro delle particelle della fase stazionaria - bisogna cercare di ottenere la massima area per unità di superficie e quindi ridurre la granulometria della fase stazionaria e il suo impaccamento nel caso di una fase stazionaria solida, lo spessore del film nel caso di fase stazionaria liquida;
- diametro della colonna - tanto minore è il diametro e tanto minore è l'allargamento di banda che si verifica;
- temperatura di esercizio - riducendo la temperatura infatti si riesce ad abbassare la velocità di diffusione longitudinale e di conseguenza il coefficiente di diffusione.

Classificazione delle tecniche cromatografiche

Le varie tecniche cromatografiche possono essere distinte in base a diversi fattori:

- Per forma del letto cromatografico:
 - Cromatografia planare (TLC (*Thin Layer Chromatography*) o su carta)

- Cromatografia su colonna (impaccata o capillare)
- Per stato fisico della fase mobile:
 - Cromatografia liquida (LC)
 - Gascromatografia (GC)
 - Cromatografia a fluido supercritico (SFC)
- Per meccanismo di separazione:
 - Adsorbimento
 - Ripartizione
 - Scambio ionico
 - Esclusione dimensionale
 - Affinità

Nei capitoli successivi si tratteranno singolarmente tutte queste tipologie di tecniche in modo più approfondito.

Esercizi

1) Eseguendo un'analisi cromatografica su una miscela di composti attraverso l'ausilio di una colonna di 20,0 cm si sono ottenuti i seguenti risultati:

Sostanza	Tempo di ritenzione [min]	W [min]
A	9,8	1,35
B	8,35	1,17

Si calcoli:

- (a) la risoluzione della colonna;
- (b) il numero dei piatti teorici per ciascuna sostanza e il numero di piatti teorici medio;
- (c) l'altezza del piatto teorico;
- (d) la lunghezza della colonna necessaria per avere una risoluzione pari a 1,5.

2) Si considerino I dati seguenti:

Sostanza	Tempo di ritenzione [min]	W [min]
non rit	2,5	-
A	4,3	0,56
B	8,1	1,01
C	9,6	1,12

Sapendo che il rapporto V_S/V_M per l'impaccamento è pari a 0,415, calcolare:

- (a) il fattore di ritenzione per ogni specie;
- (b) il fattore di selettività per le specie B-C;
- (c) la costante di distribuzione per ogni specie.

Soluzioni

1)

$$\begin{aligned}
 \text{(a)} \quad R_s &= \frac{2\Delta t}{W_1+W_2} = \frac{2(9,8-8,35)}{1,35+1,17} = 1,15 \\
 \text{(b)} \quad N_A &= 16 \left(\frac{t_R}{W} \right)^2 = 16 \left(\frac{9,8}{1,35} \right)^2 = 843 \\
 N_B &= 16 \left(\frac{t_R}{W} \right)^2 = 16 \left(\frac{8,35}{1,17} \right)^2 = 815 \\
 N_{medio} &= \frac{843+815}{2} = 829 \\
 \text{(c)} \quad HETP_{piatto} &= \frac{L_{colonna}}{N_{piatti}} = \frac{20,0}{829} = 2,4 * 10^{-2} cm \\
 \text{(d)} \quad \frac{R_{s1}}{R_{s2i}} &= \frac{\sqrt{N_1}}{\sqrt{N_2}} \\
 \frac{1,15}{1,5} &= \frac{\sqrt{829}}{\sqrt{N_2}} \\
 N_2 &= 829 \left(\frac{1,5}{1,15} \right)^2 = 1410 \\
 L &= NH = 1410 * 2,4 * 10^{-2} = 33,8 cm
 \end{aligned}$$

2)

$$\begin{aligned}
 \text{(a)} \quad k_A &= \frac{t_A-t_0}{t_0} = \frac{4,3-2,5}{2,5} = 0,72 \\
 k_B &= \frac{t_B-t_0}{t_0} = \frac{8,1-2,5}{2,5} = 2,24 \\
 k_C &= \frac{t_C-t_0}{t_0} = \frac{9,6-2,5}{2,5} = 2,84 \\
 \text{(b)} \quad \alpha &= \frac{k_C}{k_B} = \frac{2,84}{2,24} = 1,27 \\
 \text{(c)} \quad K_A &= k_A * \frac{V_M}{V_S} = 0,72 * \frac{1}{0,415} = 1,7 \\
 K_B &= k_B * \frac{V_M}{V_S} = 2,24 * \frac{1}{0,415} = 5,4 \\
 K_C &= k_C * \frac{V_M}{V_S} = 2,84 * \frac{1}{0,415} = 6,8
 \end{aligned}$$

Note

¹IUPAC. *Compendium of Chemical Terminology*, II ed. ("Gold Book"). Curato da A. D. McNaught e A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1997). Versione online (2019-) creata da S. J. Chalk. ISBN 0-9678550-9-8. <https://doi.org/10.1351/goldbook>.

²Sadek, p. 56

³Sadek, p. 174

⁴Sadek, p. 134

⁵Sheffield Hallam University, *Chromatography - Introductory theory*. <https://teaching.shu.ac.uk/hwb/chemistry/tutorials/chrom/chrom1.htm>

⁶Skoog, p. 878

⁷Skoog, p. 878

⁸Miller, p. 76

⁹Miller, p. 77

¹⁰Sadek, p. 54

¹¹Miller, p. 78

¹²Skoog, pp. 876-877

Fonte del testo:

<https://it.wikibooks.org/w/index.php?title=Cromatografia/Introduzione&oldid=393215>

Cromatografia liquida

La cromatografia liquida prevede l'utilizzo di un solvente liquido come fase mobile.

1.1 Caratteristiche generali

La cromatografia liquida può essere suddivisa in due grandi categorie:

- cromatografia liquida classica;
- cromatografia liquida ad alta prestazione (*HPLC*).

La prima non ha un grande interesse in ambito analitico in quanto viene solitamente usata solo a scopi preparativi e prevede l'utilizzo di una strumentazione simile a quella che venne usata da Tswett nel 1906. Questa tecnica prevede l'utilizzo di una colonna di vetro riempita con una sospensione di gel di silice in testa alla quale viene caricato il campione che viene poi eluito con dei solventi scelti in base al tipo di analita.

La cromatografia liquida ad alta prestazione è invece la tecnica più usata in ambito analitico e trova molte applicazioni anche in ambito industriale e nella ricerca scientifica. È una tecnica cromatografica molto efficace e versatile in quanto permette di separare due o più composti presenti in un campione in poco tempo, realizzando la separazione di miscele anche molto complesse oltre a fornire, se accoppiata con un rivelatore adatto, la composizione quantitativa della miscela in esame. L'HPLC è infatti in grado di separare composti con un peso molecolare che va da 54 a 450.000 Da anche con quantità di campione estremamente piccole, fino a dimensioni nell'ordine dei nanogrammi.¹ La cromatografia liquida è estremamente versatile in quanto può essere utilizzata per separare ed analizzare un grande numero di composti: sia sostanze con bassa tensione di vapore come le macromolecole e i composti ionici, sia prodotti termolabili (amminoacidi e acidi nucleici) altrimenti non analizzabili con altre tecniche quali ad esempio la gascromatografia. È considerata l'evoluzione della strumentazione usata nella cromatografia liquida classica: prevede l'utilizzo di colonne particolari che vengono sottoposte ad un flusso di eluente sotto pressione. Il fatto di lavorare a pressione molto elevate è alla base dell'efficienza di questa tecnica in quanto consente di avere una fase stazionaria molto fine e ben impaccata, necessaria per ottenere una buona risoluzione come si evince dall'equazione di Van Deemter, senza per questo allungare troppo i tempi di eluizione. Per contro, lavorare sotto pressione fa alzare considerevolmente i costi della strumentazione, in quanto talvolta sono necessarie pressioni che possono raggiungere valori nell'ordine di cen-

tinaia di atmosfere. Questo aspetto, unito alle esigenze relative alla strumentazione necessaria, viene ampiamente compensato dall'efficienza della separazione.

I solventi che vengono usati come fase mobile per la cromatografia subiscono spesso un processo di degasaggio che prevede la saturazione dei recipienti di stoccaggio dei solventi con gas inerte al fine di rimuovere l'aria eventualmente presente. In alternativa si può eseguire un degasaggio ad ultrasuoni al momento del riempimento dei recipienti di solvente, o ancora filtrazione in aspirazione.² Il motivo per cui si esegue questo procedimento sta nel fatto che si vuole evitare l'entrata di bolle d'aria all'interno della colonna perché queste costituiscono un elemento di discontinuità nel sistema e possono quindi incidere negativamente sull'analisi.

La strumentazione necessaria per eseguire un'analisi HPLC può essere così schematizzata:

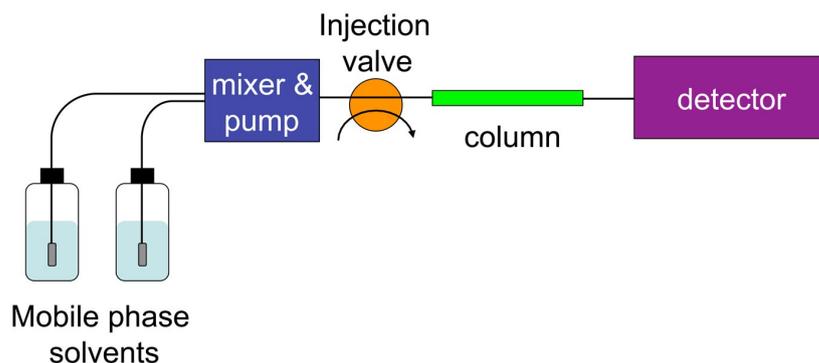


Fig. 1.1: Schema a blocchi di un HPLC

1.2 Pompe

I flussi che vengono generalmente ottenuti variano da 0,1 a 10 mL/min e hanno una riproducibilità non inferiore allo 0,5%.³ Le pompe usate per l'HPLC devono soddisfare i seguenti requisiti:

- il flusso di eluente deve essere costante e privo di pulsazioni per garantire costante la velocità della fase mobile e per evitare la generazione di impulsi di pressione al momento della compressione, generando così discontinuità all'interno della colonna;
- devono essere in grado di lavorare ad alte pressioni;
- devono essere resistenti alla corrosione (per questo la parte a contatto con l'eluente è spesso costituita da materiali chimicamente inerti);
- devono fornire la possibilità di realizzare gradienti di solvente riproducibili.

Sono presenti diversi tipi di pompe a seconda delle richieste dell'analisi. Tra queste ci sono:

- pompa a siringa;
- pompa alternativa reciprocante a singola testa;
- pompa alternativa reciprocante a doppia testa.

La **pompa a siringa** è costituita da una camera cilindrica che viene riempita di fase mobile la quale viene poi spinta in colonna da un pistone. Il vantaggio di queste pompe è che sono molto robuste, il che consente di operare ad elevate pressioni, e che garantiscono la totale assenza di impulsi, questo perché il pistone si muove in modo

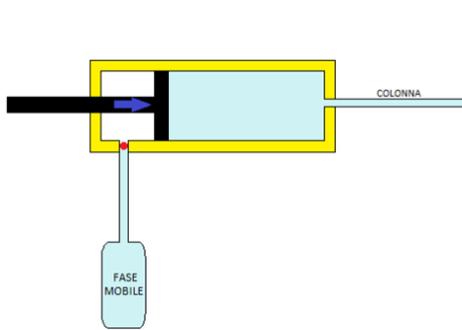


Fig. 1.2: Pompa a siringa

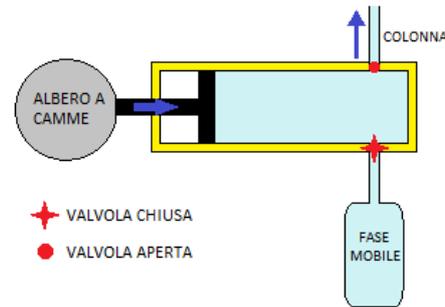


Fig. 1.3: Pompa alternativa reciprocante a singola testa

continuo e a velocità costante. Per contro però presentano una capacità limitata (di solito 250 mL⁴) e non consentono l'esecuzione di un'eluizione a gradiente di solvente.

Le pompe alternativa reciprocanti sia a singola che a doppia testa sono le pompe più usate in cromatografia liquida, hanno un piccolo volume interno che varia da 35 a 400 mL ed elevata pressione interna che può arrivare fino a 10.000 psi.⁵

La **pompa alternativa reciprocante a singola testa** è costituita da un albero a camme che muove alternativamente un pistone avanti e indietro nella camera di iniezione. Questa è dotata di due valvole: una che regola l'entrata dell'eluente e l'altra che serve ad indirizzarlo verso la colonna. Quando il pistone si muove all'indietro la valvola del solvente è aperta mentre quella che conduce alla colonna è chiusa, in questo modo la camera si riempie di fase mobile. Quando invece il pistone si muove in avanti spinge il solvente verso la colonna passando attraverso la valvola superiore. In questa fase di compressione la valvola che fa entrare il solvente nella camera è mantenuta chiusa.

La **pompa alternativa reciprocante a doppia testa** è invece costituita da due unità come quella sopra presentata. L'albero a camme in questo caso muove alternativamente i due pistoni presenti nelle camere: in questo modo quando una delle due si sta riempiendo di solvente l'altra lo sta scaricando verso la colonna. In questo modo si sfruttano entrambi i movimenti del pistone senza che la corsa cromatografica debba essere interrotta per riempire la camera. Il grande vantaggio rappresentato da quest'ultima tipologia di pompa è dato dal fatto che il movimento alternato del pistone avanti e indietro permette di sovrapporre gli impulsi in controfase e quindi di smorzare l'oscillazione del flusso che altrimenti costituirebbe un elemento di discontinuità nell'analisi.

Per migliorare ulteriormente il risultato e rendere ancora più costante il flusso della fase mobile, si possono sfruttare degli smorzatori di impulso che vengono posizionati a valle della pompa.

Un importante ulteriore vantaggio di questa tipologia di pompe è il fatto che rendono possibile l'utilizzo di solventi diversi e in differenti proporzioni: è quindi possibile fare non solo eluizioni isocratiche ma anche a gradiente di solvente.

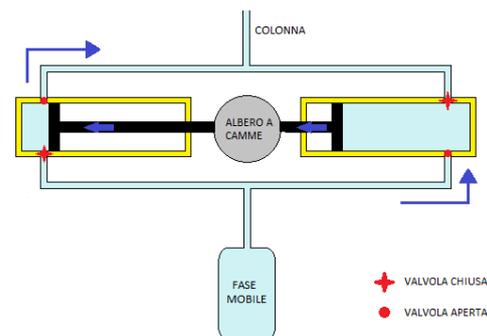


Fig. 1.4: Pompa alternativa reciprocante a doppia testa

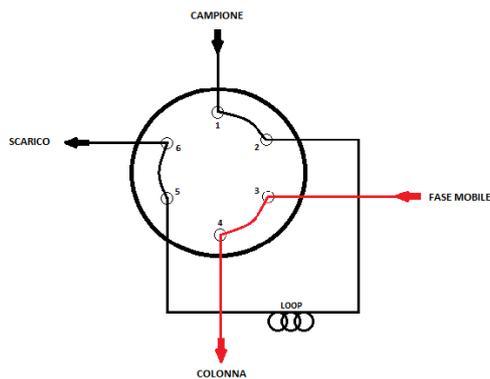


Fig. 1.5: Valvola commutativa in assetto di carico

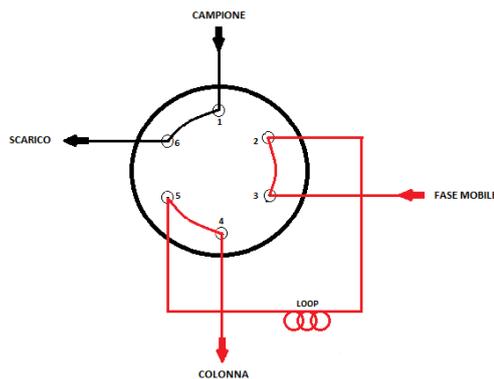


Fig. 1.6: Valvola commutativa in assetto di iniezione

1.3 Iniettori

Il sistema di iniezione utilizzato per l'introduzione del campione in colonna prevede l'utilizzo di una valvola commutativa la quale è dotata di sei fori e che può assumere due assetti differenti a seconda che sia impostata in fase di carico o di iniezione. Durante la fase di carico il campione viene fatto entrare nel loop, un capillare di volume fisso e noto, fino al suo completo riempimento: per essere sicuri che ciò avvenga viene iniettato più campione di quello che il loop è in grado di contenere e l'eccesso viene scaricato nello smaltimento.

L'utilizzo di questo capillare, di cui è perfettamente noto il volume, si rende necessario in quanto iniettare volumi così piccoli con altri metodi sarebbe poco accurato e preciso, al contrario iniettare volumi maggiori e scartare l'eccesso permette di minimizzare l'errore percentuale sul volume totale.

Per modificare il volume di campione iniettato in colonna sarà quindi sufficiente usare un loop a capienza differente. Nel frattempo la fase mobile viene fatta fluire direttamente in colonna. Una volta che il loop si è riempito, la valvola ruota e passa all'assetto di iniezione: la fase mobile viene forzata attraverso il loop spingendo il campione in colonna, mentre il campione in eccesso va direttamente allo scarico, in questo modo si è sicuri che il volume di campione che entra in colonna è solo quello contenuto nel loop.

Per omogeneizzare il sistema è necessario condizionare la colonna, ovvero eseguire un processo di pulizia volto ad eliminare le specie eventualmente adsorbite sul rivestimento interno della colonna, oltre ai residui del solvente utilizzato nelle analisi precedenti.⁶ Dal punto di vista pratico tale operazione viene eseguita facendo fluire un volume di fase mobile pari a circa sei volte il volume della colonna.⁷ Una tipica analisi HPLC viene svolta con volumi di circa $20 \mu\text{L}$ di solvente contenenti circa 10-50 ng di campione, i flussi solitamente raggiungono una velocità di circa 1-2 mL/min e impiegano tempi diversi a seconda che l'analisi sia eseguita in isocratica (circa 10 minuti) o a gradiente di solvente (1 ora).⁸

1.4 Colonne

Le colonne usate in HPLC sono solitamente realizzate in acciaio inox in quanto è un materiale che ben soddisfa le esigenze di pressione e inerzia chimica nei confronti dei solventi usati.

Lunghezza e diametro sono variabili a seconda dello scopo per cui vengono utilizzate: quelle destinate a scopi preparativi sono solitamente più grandi e più lunghe perché devono essere delle dimensioni adeguate per lavorare con grandi quantità di sostanze, quelle analitiche invece sono più piccole. Le dimensioni per queste ultime sono 2-5 cm di diametro e hanno una lunghezza che arriva ad un massimo di 25 cm.⁹

Bisogna comunque tenere a mente il fatto che colonne più lunghe richiedono pressioni più elevate e quindi il processo di eluizione diventa più lungo e complesso da gestire per via delle condizioni più drastiche. Si cerca infatti di lavorare con colonne che siano il più corte possibili usando una fase stazionaria con granulometria molto fine.

Una colonna è dotata di due filtri posizionati alle estremità: quello presente all'imboccatura serve per evitare che vi entrino delle particelle che possono andare ad ostruirla, mentre quello che si trova all'estremità di uscita della colonna serve a trattenere la fase stazionaria in modo che non venga pompata all'interno del rivelatore.¹⁰

Quando vengono fabbricate non hanno un verso di utilizzo preferenziale, ma una volta utilizzate vanno orientate poi sempre nello stesso verso: il flusso di solvente all'interno infatti provoca un riarrangiamento della fase stazionaria che rischia di venire danneggiata in caso di inversione del flusso. Solitamente si esegue questa pratica solamente in casi estremi nel tentativo di salvare una colonna danneggiata come ad esempio nel caso in cui ci siano segni di sovrappressione o nel caso in cui sia intasata.

Ci sono diversi fattori che possono andare ad intaccare e compromettere l'efficienza della colonna:

1. Perdita della fase legata - questo effetto può essere causato principalmente da due effetti: pH troppo basso o temperatura troppo alta. Il pH di esercizio deve essere circa compreso tra 2,5 e 7,5.¹¹ Gli impaccamenti per le colonne cromatografiche vengono generalmente realizzati per reazione tra silani e il gruppo -OH della silice con formazione di silossani. Dal momento che tale reazione è fortemente influenzata dal pH, occorre che questo venga mantenuto in un intervallo di esercizio tale da non modificare la forma in cui si trova la superficie costituente l'impaccamento della colonna: quando il pH scende a valori inferiori a 2,0 unità di pH, infatti, il legame silossanico viene rotto con formazione di silanoli che, essendo più polari rispetto ai silossani corrispondenti, aumentano lo scambio cationico della superficie. Allo stesso modo elevate temperature possono produrre diversi effetti sulla colonna: innanzitutto può andare ad aumentare la solubilità della silice e accelerare la formazione di zone svuotate. Se poi questo avviene a pH bassi il rischio è che si abbia la rimozione di parte della fase legata che si può facilmente riconoscere nel cromatogramma in quanto è caratterizzata dalla presenza di 4 picchi caratteristici. Un altro aspetto che può portare alla formazione di questo effetto è dato dall'ossidazione della fase legata: per questo motivo infatti si esegue il degasaggio dei solventi.
2. Aumento della pressione - ogni colonna ha un limite superiore di pressione che può essere tollerato e che qualora questo venga superato può provocare diversi problemi. Innanzitutto ci sono tre diversi punti della colonna in cui può verificarsi tale aumento di pressione: all'imboccatura, nel letto della colonna o in corrispondenza dell'uscita. All'imboccatura della colonna è presente un filtro che è in grado di raccogliere ogni particella di dimensioni superiori a 2 μm : più materiale viene raccolto e più la pressione tende ad aumentare. Il filtro posizionato in testa alla colonna può essere anche otturato da del tampone

precipitato. In questi casi per risolvere il problema si può sostituire il filtro. Si agisce nello stesso modo qualora l'aumento della pressione sia localizzato in corrispondenza del filtro posizionato in fondo alla colonna, una valida alternativa prevede l'esecuzione di una sonicazione con NaOH 10% per pulire la colonna.¹² Se l'aumento di pressione persiste allora vuol dire che il problema riguarda il letto della colonna. Questo può essere causato dalla precipitazione del campione o del tampone e si verifica soprattutto se si lavora con soluzioni molto concentrate, quasi sature. Se l'otturazione non è completa e la fase mobile riesce comunque a fluire attraverso la colonna, seppur a fatica, si può provare a risolvere il problema usando un eluente estremamente forte, oppure, in casi estremi, si può provare ad invertire la colonna.

3. Canalizzazione della colonna - questo effetto prevede la formazione di cammini preferenziali all'interno della colonna in cui la resistenza allo scorrimento del flusso è minore. In questa porzione del letto cromatografico le zone di interfaccia tra le due fasi sono più limitate e la colonna risulta quindi essere meno efficiente nella separazione, ne consegue quindi che i tempi di ritenzione si accorciano.¹³ Questo effetto porta allo slargamento delle bande in uscita dalla colonna a cui consegue l'ottenimento di picchi scodati.¹⁴
4. Effetti che dissolvono la fase stazionaria della colonna o che compromettono l'imballaggio stesso - questo effetto si verifica soprattutto a $\text{pH} > 8$ in quanto in queste condizioni la silice che costituisce la fase stazionaria inizia a dissolversi formando delle zone vuote all'interno del riempimento della colonna, per questo motivo il limite superiore di pH di esercizio è posto a 7,5.¹⁵
5. Materiali che si legano alla colonna - questo effetto si verifica quando del materiale rimane incastrato nel riempimento oppure va a rivestire la superficie della fase stazionaria cambiando quindi le caratteristiche della colonna.

All'interno della colonna si trova la fase stazionaria che è composta da particelle molto fini e disposte in modo uniforme con granulometria compresa tra i 3 e i 10 μm ,¹⁶ funzionalizzate a seconda della necessità. Si possono avere:

- particelle pellicolari - costituite di granuli di silice o di altro polimero su cui è depositato un sottile strato di fase stazionaria liquida o di resina scambiatrice;
- particelle porose - costituite di granuli di silice, zeoliti o altri polimeri la cui componente attiva è costituita dalla stessa superficie delle particelle.

Per avere la miglior efficienza e quindi le migliori prestazioni possibili è necessario avere il migliore impaccamento e quindi un diametro delle particelle della fase stazionaria molto piccolo, per contro però bisogna tenere a mente che un impaccamento molto compatto comporta una maggiore contropressione: sarà quindi necessario trovare il giusto compromesso tra questi due aspetti.

Le interazioni che si instaurano fra i soluti e le due fasi, stazionaria e mobile, sono deboli e reversibili in modo che l'analita venga comunque eluito in condizioni opportune. Se così non fosse e questo non avvenisse, non ci sarebbe eluizione o ritenzione da parte della fase stazionaria perché l'analita rimarrebbe bloccato all'interno della colonna.

Le interazioni che si stabiliscono sono deboli quali ad esempio:

- legame a idrogeno;
- interazioni coulombiane;
- interazioni steriche;
- forze di Van der Waals;
- interazioni dipolo-dipolo;

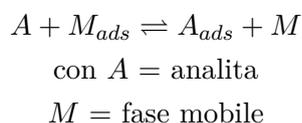
- interazioni dipolo-dipolo indotto;
- interazioni dipolo indotto-dipolo indotto.

In base ai meccanismi di interazione dell'analita con la fase stazionaria si può eseguire una distinzione tra i meccanismi cromatografici. Il principio alla base è però sempre lo stesso ovvero che la fase stazionaria interagisce con i componenti da separare in modo diverso modificando così la velocità con cui si muovono lungo la colonna e quindi agendo sul loro tempo di ritenzione.

La **cromatografia di adsorbimento** è utilizzata per separare sostanze sia inorganiche che organiche. In particolare è adatta per sostanze moderatamente o poco polari, solitamente insolubili in acqua e con $PM < 5000$. È spesso usata anche per separare miscele di isomeri come ad esempio regioisomeri.

La fase stazionaria si presenta come una polvere molto fine impaccata in colonna i cui siti attivi si trovano sulla superficie dei granuli ed è solitamente costituita da allumina o silice: sebbene abbiano caratteristiche di adsorbimento confrontabili tra loro la più usata è la silice in quanto ha una maggior varietà di forme utili.¹⁷ Può essere applicata sia alla cromatografia liquida che alla gascromatografia, l'unica differenza sarà data dalla fase mobile, che nel primo caso sarà costituita da un liquido e nel secondo da un gas.

Tra l'analita e la fase stazionaria si formano dei legami deboli che trattengono momentaneamente l'analita in colonna: questi legami sono reversibili e vengono rotti e riformati innumerevoli volte durante la corsa cromatografica, causando il rallentamento dell'analita rispetto al solvente puro. L'ordine di eluizione delle componenti presenti nel campione dipende dall'affinità che queste hanno con la fase stazionaria: tanto più questa è elevata e tanto più sono lunghi i tempi di ritenzione. L'unica variabile su cui si può intervenire per modificare i coefficienti di distribuzione degli analiti nelle due fasi è la composizione della fase mobile: la forza dell'interazione tra l'analita e la fase stazionaria infatti, aumenta all'aumentare della polarità dell'analita stesso, per cui le molecole a polarità maggiore saranno quelle che verranno eluite a tempi maggiori perché più saldamente trattenute in colonna. Per questo motivo infatti, per diminuire i tempi di ritenzione, si può andare ad aumentare la polarità del solvente secondo la serie eluotropica che consiste in una classificazione dei solventi in ordine crescente di potere eluente riferita all'allumina. Si misura il calore che si sviluppa mettendo a contatto allumina e il solvente: più l'interazione che si instaura tra le due è forte e più il solvente si trova avanti nella serie eluotropica. Essendo:¹⁸



Da cui si può notare come il passaggio del solvente possa spostare l'equilibrio a favore dell'eluizione dell'analita: il solvente infatti rende reversibile il processo per effetto di massa.

Per evitare che sostanze polari restino trattenute in colonna e non vengano eluite, è consigliabile usare sempre almeno una piccola percentuale di componente polare nel solvente.

La **cromatografia di ripartizione** è una delle tecniche cromatografiche più utilizzata, ha diverse applicazioni in ambito farmaceutico, ambientale, forense e molti altri.

La fase stazionaria è costituita da un film liquido che ricopre un supporto solido solitamente costituito da un materiale granulare e inerte. Il requisito fondamentale di questa tecnica è che la fase mobile e il liquido della fase stazionaria devono essere immiscibili tra loro pur presentando entrambe una certa affinità per gli analiti. Questo tipo di cromatografia si basa sul meccanismo di ripartizione dell'analita nei due solventi: la fase mobile e il film liquido della fase stazionaria. Il fattore da cui dipende la separazione è costituito dalla solubilità relativa dell'analita nei due liquidi (si parla infatti di cromatografia di ripartizione liquido-liquido). L'ordine di eluizione dipende dall'affinità dell'analita per la fase stazionaria: tanto più questi saranno solubili nel film costituente la fase stazionaria e tanto più a lungo verranno trattenuti in colonna.

A seconda della polarità dei due solventi usati si avrà un diverso tipo di cromatografia:

- fase normale - si ha quando la fase stazionaria è più polare della fase mobile. Le miscele usate più comunemente come fase mobile prevedono l'uso di esano¹⁹ (che essendo apolare non interagisce con la fase stazionaria che è scelta invece molto polare) e un altro solvente come cloroformio o propan-2-olo. Quest'ultimo è chiamato solvente attivo o modificatore in quanto è in grado di competere con l'analita per i siti attivi della fase stazionaria. La concentrazione del solvente attivo che viene inserita nella miscela influenza molto l'eluizione: all'aumentare della concentrazione infatti la solubilità dell'analita nella fase mobile aumenta e di conseguenza il tempo di ritenzione diminuisce. La fase stazionaria invece presenta gruppi amino, ciano e dioli;
- fase inversa - si ha quando la fase mobile è più polare della fase stazionaria. In questo caso la fase mobile è costituita da una miscela di acqua (che, essendo molto polare, non interagisce con la fase stazionaria che è invece molto apolare) e un altro solvente attivo come metanolo, acetonitrile e tetraidrofurano. Una delle fasi mobili più usata è una miscela 60/40 H₂O / EtOH.²⁰ La fase stazionaria è invece solitamente costituita da C2, C8, C18, tenendo a mente il fatto che all'aumentare del numero di atomi di carbonio aumenta la capacità di ritenzione.

La cromatografia di ripartizione a fase inversa è la più comune e la più usata delle due per la separazione di composti organici, in particolare miscele idrocarburiche.

Molto spesso il film liquido è legato chimicamente alla fase stazionaria con legami covalenti attraverso silani e silanoli.

Anche in questo caso l'eluizione può essere condotta in isocratica o a gradiente di solvente: in quest'ultimo caso sarà sufficiente variare la composizione della miscela di fase mobile per aumentare la forza del solvente e fare quindi diminuire i tempi di ritenzione.

La **cromatografia a scambio ionico** è una tecnica cromatografica che viene utilizzata per separare sostanze ioniche o ionizzabili. Con questa tecnica si analizzano amminoacidi, acidi grassi e alcaloidi. La fase stazionaria è costituita da un polimero inerte funzionalizzato con siti attivi ionizzanti o ionizzabili, neutralizzati da controioni facilmente sostituibili da ioni aventi carica dello stesso segno presenti nella fase mobile. Questa tipologia di cromatografia non è in grado di separare composti privi di carica o aventi carica coerente con la fase stazionaria costituente l'impaccamento della colonna. Il meccanismo di separazione si basa sulla competizione dei singoli ioni della fase mobile e dell'analita per i siti attivi di scambio della fase stazionaria.

Il meccanismo di scambio ionico prevede quattro fasi:

- diffusione dello ione dell'analita sulla superficie della resina;

- scambio ionico tra lo ione analita e lo ione precedentemente trattenuto dalla fase stazionaria - tanto maggiori sono le dimensioni e la carica dello ione e tanto meglio questo viene trattenuto in colonna. Dal momento che è fondamentale che l'analita sia nella forma ionica desiderata, è necessario controllare il pH, per questo motivo infatti si aggiunge spesso un tampone. Nel caso in cui i target dell'analisi siano specie anioniche il pH deve assumere valori sufficientemente elevati da avere la specie in forma deprotonata, viceversa in caso di specie cationiche. Valutazioni di questo tipo sono fondamentali ad esempio in caso di analisi di amminoacidi in quanto a seconda del pH di esercizio possono trovarsi in forma acida, basica o zwitterionica. Questo aspetto può però costituire un limite dal momento che talvolta anche la fase stazionaria può avere degli intervalli di pH di lavoro differenti da quelli necessari per avere la specie in forma ionica;
- allontanamento del controione e sua diffusione nella resina;
- eluizione selettiva degli analiti legati alla resina - andando a variare il pH e quindi aumentando la concentrazione del tampone, la forza ionica, aggiungendo KCl o NaCl, o entrambi. Anche in questo caso verranno eluite prima le specie che avranno con la fase stazionaria interazioni più deboli.

La **cromatografia a esclusione dimensionale** è una tecnica che viene applicata prevalentemente a macromolecole organiche (usata in particolare per purificarle e determinare il loro peso molecolare) e per i polimeri. Tolta questa applicazione è solitamente poco utilizzata per analisi quantitative e impiegata soprattutto nella sintesi organica.

La fase stazionaria è un solido o un gel che presenta dei pori di dimensioni note e opportune quali ad esempio la silice, il vetro o polimeri particolari. La silice è molto usata in quanto è più rigida e garantisce un impaccamento migliore, il che consente di adottare pressioni maggiori e al contempo una più vasta gamma di solventi.²¹ In questo caso la fase mobile ha solo funzione di trasporto e la sua natura chimica non è particolarmente rilevante dal punto di vista della buona riuscita dell'analisi. Le molecole di analita che vengono disciolte nell'eluente vengono ripartite a seconda della loro capacità di penetrare nelle porosità della fase stazionaria e rimangono intrappolate. Tanto più piccolo sarà il diametro delle particelle di analita e tanto più riusciranno a penetrare in profondità nella fase stazionaria e quindi tanto più a lungo verranno trattenute in colonna: le molecole troppo grandi non riusciranno ad entrare nei pori e usciranno dalla colonna per prime.²²

Si possono definire alcuni parametri fondamentali in ambito di cromatografia ad esclusione dimensionale:

- limite di esclusione - massa della particella più piccola le cui dimensioni sono tali da impedirle di entrare all'interno delle porosità della fase stazionaria. Tutte le sostanze aventi massa molare pari o superiore al limite di esclusione verranno eluite insieme ed usciranno per prime dalla colonna;
- limite di permeazione - massa molare della particella più grossa che riesce comunque ad entrare nei pori. Tutte le sostanze aventi massa uguale o inferiore al limite di permeazione verranno trattenute in colonna per tempi differenti a seconda della compatibilità dimensionale tra il diametro della particella e il diametro delle porosità;
- intervallo di frazionamento - intervallo delle masse molari delle molecole che vengono separate dalla colonna. Questo intervallo di massa è compreso tra il limite di permeazione e il limite di esclusione.

A seconda che le sostanze da analizzare siano solubili o meno in acqua avremo due tecniche simili ma differenti:

- gel filtrazione - sostanze insolubili in acqua;
- gel permeazione - sostanze solubili in acqua, in questo caso il supporto costituente la fase stazionaria è generalmente costituito da silice.

Dal momento che il fattore discriminante per la separazione è la dimensione dei pori della fase stazionaria, prima di procedere con l'analisi è necessario costruire una curva di calibrazione usando degli standard a massa molare nota: quello che si va a valutare è la capacità della colonna di separarli. Grazie alla costruzione di questo grafico semi-logaritmico è possibile ricavare l'intervallo di frazionamento utile per la separazione.

Sono inoltre presenti altre tipologie di colonne usate in HPLC e che prendono il nome di precolonne: tra queste ci sono la colonna scavenger e la colonna di guardia.

La colonna scavenger, detta anche colonna di saturazione, è posizionata tra i recipienti di fase mobile e l'iniettore e viene usata per condizionare la fase mobile quando le condizioni operative sono tali da andare ad intaccare l'impaccamento della colonna analitica e dissolverla (a pH e a temperature elevate). La fase mobile, fluendo attraverso questa precolonna dissolve parte dell'impaccamento silicico fino ad arrivare alla saturazione, in questo modo quando l'eluente raggiunge la colonna analitica è già saturato con acido silicico e non intacca la fase stazionaria della colonna separativa.²³

La colonna di guardia viene posizionata tra l'iniettore e la colonna analitica e il suo scopo è quello di rimuovere preventivamente le impurezze presente nel campione che potrebbero otturare o danneggiare la colonna separativa. È impaccata con una fase stazionaria uguale o simile alla colonna analitica e deve essere pulita o sostituita regolarmente per evitare che del materiale da essa trattenuta possa intaccare la colonna. È solitamente di piccole dimensioni (1-3 cm) e non prende parte al processo separativo.²⁴

1.5 Rivelatori

Il rivelatore è l'ultimo elemento costituente la strumentazione necessaria per eseguire un'analisi HPLC e serve per misurare la concentrazione del campione in uscita dalla colonna sfruttando una grandezza chimica o fisica ad essa proporzionale. Quando questo viene attraversato solo dalla fase mobile il rivelatore registra un segnale costante che viene detto linea di base, quando insieme alla fase mobile vi è anche un analita allora il rivelatore dà un aumento della risposta che si traduce in un segnale grafico attraverso un picco cromatografico. A seconda delle caratteristiche che vengono rivelate si parla di:

- bulk properties - se si misura una caratteristica della fase mobile che indirettamente rivela gli analiti, ad esempio l'indice di rifrazione;
- solute properties - se si misura una caratteristica del soluto quale ad esempio l'assorbanza o la fluorescenza. Le caratteristiche principali che un rivelatore deve soddisfare sono:²⁵
- adeguata sensibilità;
- buona stabilità e riproducibilità (il risultato deve essere stabile nel tempo e nelle diverse condizioni operative);
- risposta lineare alla concentrazione dell'analita in un intervallo piuttosto ampio;

- piccolo volume morto per rendere minimo l'allargamento di banda dopo l'uscita dalla colonna: al termine della corsa cromatografica infatti non c'è più alcun elemento che garantisca il mantenimento della separazione, per cui un tratto lungo tra l'uscita della colonna e il rivelatore favorirebbe il rimescolamento dell'eluato e quindi fenomeni di diffusione con il conseguente slargamento dei picchi;
- tempi di risposta rapidi e indipendenti dalla velocità del flusso;
- bassi limiti di rivelabilità;
- alta affidabilità e facilità d'uso;
- preferibilmente non distruttivo.

Bisogna tenere conto del fatto che si cerca inoltre sempre di evitare di derivatizzare il campione per non rischiare di eccedere nella manipolazione ed introdurre ulteriori errori. Il grande vantaggio di questa tecnica è però dato dal fatto che si aumenta molto la specificità dell'analisi perché si può scegliere un agente derivatizzante ad hoc per l'analita.

Tra i rivelatori più usati ci sono:

- Fotometro UV-visibile a λ fissa - misura l'assorbanza dell'eluato a lunghezza d'onda fissa. La sorgente più usata è la lampada a vapori di mercurio la quale è una sorgente a righe: l'intensità maggiore che si registra con questa sorgente corrisponde alla lunghezza d'onda di 254 nm.²⁶ La radiazione attraversa la cella contenente il campione per poi arrivare al fotodiode diminuita di intensità: secondo la legge di Lambert Beer infatti l'intensità della luce assorbita è proporzionale alla concentrazione dell'analita. Il grande vantaggio di questo rivelatori è il fatto che sia estremamente sensibile grazie all'elevata intensità della radiazione che viene prodotta dalla lampada a vapori di Hg, per contro però è caratterizzata da una scarsa selettività dovuta al fatto che si può lavorare solamente ad una lunghezza d'onda.
- Spettrofotometro UV-visibile a λ variabile - è il rivelatore più usato in HPLC. La sorgente luminosa è costituita da una lampada a deuterio che genera una radiazione UV continua che copre un intervallo di lunghezze d'onda che vanno da 190 a 425 nm.²⁷ La radiazione così ottenuta viene poi indirizzata ad un monocromatore a reticolo: in questo modo viene scissa nelle sue componenti, il che consente di selezionare la lunghezza d'onda desiderata in un range piuttosto ampio. La radiazione selezionata incide sulla cella a flusso contenente il campione, la attraversa e viene parzialmente assorbita: la diminuzione dell'intensità della luce trasmessa viene misurata da un fotodiode ed è proporzionale alla concentrazione di analita. Il fatto che si possa lavorare a diverse lunghezze d'onda presenta numerosi vantaggi: elevata versatilità in quanto si può lavorare a diverse λ , elevata sensibilità data dal fatto che si può scegliere la λ ottimale per un determinato analita, elevata selettività in quanto in caso di sovrapposizione di picchi si può cambiare λ di lavoro per minimizzare l'assorbimento degli interferenti.
- Spettrofotometro UV-vis con Diode-Array - la sorgente impiegata è costituita da una lampada a deuterio che genera una radiazione UV che viene indirizzata ad un monocromatore a reticolo: in questo modo viene scissa nelle sue componenti. Il fascio luminoso non monocromatico passa nella cella a flusso, interagisce con l'analita, esce dalla cella e viene scomposto da un policromatore. A questo punto ogni λ viene focalizzata su un diverso fotodiode di un array e misurata simultaneamente. I vantaggi di questo rivelatore sono gli stessi dello spettrofotometro UV-visibile a λ variabile ma i costi sono più elevati. Con

questo rivelatore si riesce però ad ottenere lo spettro completo di assorbimento dell'eluato in ogni istante dell'analisi.

- Spettrofluorimetro - usato solo per sostanze fluorescenti o derivatizzabili. È però uno dei rivelatori più sensibile e selettivo, molto più dei rivelatori UV.²⁸ Si consideri il fatto che qualora la sostanza in esame possa essere rivelata sia con un rivelatore a fluorescenza sia con un rivelatore UV, si tende a preferire il primo dei due in quanto la sensibilità che questo ha nei confronti dell'analita è dalle due alle dieci volte maggiore.²⁹
- A indice di rifrazione - viene utilizzato molto raramente in quanto essendo un rivelatore universale risponde ad ogni sostanza presente nell'eluato. È infatti molto poco sensibile e non selettivo, per questo motivo si usa solo per sostanze che non assorbono nell'UV-vis. Misura la differenza dell'indice di rifrazione tra la cella del campione e una cella contenente l'eluato, il quale agisce da riferimento. Nella cella viene fatto passare una radiazione monocromatica: se nell'eluato non è presente alcuna sostanza oltre all'eluente il raggio non viene deviato, se invece sopraggiunge un analita, il raggio viene deviato proporzionalmente alla sua concentrazione la quale viene rivelata dal rivelatore. Il grande limite di questo rivelatore è dato dal fatto che non può essere usato per la cromatografia a gradiente di solvente³⁰ perché non è possibile avere due flussi identici nel riferimento e nella colonna, il che ne limita molto l'applicabilità. È inoltre estremamente sensibile a variazioni di pressione e temperatura.
- Elettrochimici - sono rivelatori molto selettivi e sensibili.³¹ A seconda della proprietà che misurano si dividono in:
 - Amperometro - sfrutta l'ossidazione o riduzione dell'analita a seguito dell'applicazione di un potenziale noto.
 - Conduttometro - misura la conducibilità della fase mobile ed è particolarmente utile per rivelare analiti ionici.
 - Potenzimetro - misura la variazione di potenziale dell'eluato quando l'analita reagisce con un opportuno ossidante o riducente.
 - A costante dielettrica - misura la polarità dell'eluato che attraversa la cella.
- Accoppiamento con spettrometria di massa - fornisce in ogni istante lo spettro di massa dell'eluato e permette di ottenere molte informazioni in più rispetto agli altri rivelatori.
- Spettrofotometro IR - usato molto raramente, ovvero quando si ha a che fare con analiti non centrosimmetrici. L'applicabilità è inoltre limitata dall'assorbimento della fase mobile nel range dell'infrarosso.

1.6 Esempio di applicazione

Un esempio di applicazione dell'HPLC prevede la separazione di una miscela di farmaci antinfiammatori non steroidei (FANS) e loro successiva identificazione e quantificazione. Nel caso suggerito la strumentazione utilizzata e le condizioni operative sono le seguenti:

- colonna 4,6 x 150 mm, fase stazionaria RP C18 con granulometria 4 μm ;
- fase mobile 40% mix H_2O con 0,1% H_3PO_4 , 60% CH_3CN ;
- flusso 1 mL/min;
- volume di iniezione 20 microlitri;
- rivelatore UV diode array con acquisizione nell'intervallo di lunghezze d'onda compreso tra 190-500 nm;

- analisi isocratica a 40°C.

La miscela proposta contiene i seguenti analiti: naprossene, diclofenac e ibuprofene. Innanzitutto si analizzano separatamente soluzioni standard contenenti gli analiti per determinare i tempi di ritenzione che serviranno in seguito a identificare i composti. I dati ottenuti sono i seguenti:

Analita	Tempo di ritenzione [min]
Naprossene	2,45
Diclofenac	3,68
Ibuprofene	4,18

Si esegue quindi l'analisi della miscela incognita lasciando invariate le condizioni operative e si confrontano i tempi di ritenzione ottenuti nella miscela incognita con quelli relativi agli standard, in questo modo si riesce quindi a svolgere un'analisi qualitativa che prevede l'identificazione degli analiti presenti nella miscela di partenza.

Analita	Tempo di ritenzione [min]	Area [mAU*s]
Naprossene	2,448	400
Diclofenac	3,686	183
Ibuprofene	4,177	424

Successivamente, per svolgere anche l'analisi quantitativa, si procede andando a preparare e poi ad analizzare diverse soluzioni standard a concentrazione nota crescente. Si ottengono in questo modo i punti necessari alla costruzione di una retta di taratura la quale viene costruita riportando su un grafico l'area media del picco (mAU*s) in funzione della concentrazione (ppm). Tale metodo viene eseguito per tutti gli analiti oggetto di analisi (nel caso presentato si dovranno quindi preparare tre rette di taratura, una per analita). In questo caso verrà proposto come esempio la costruzione della retta di calibrazione per l'ibuprofene ma la stessa metodica può essere applicata agli altri analiti.

Concentrazione [ppm]	Tempo di ritenzione [min]	Area [mAU*s]
5	4,185	177
10	4,186	400
20	4,186	794

Ottenuta una retta di taratura del tipo $y = mx + q$ si procede al calcolo della concentrazione dell'analita con la seguente formula:

$$C_{analita} = \frac{y - q}{m}$$

Dove y è l'area del picco dell'analita nella miscela oggetto di esame.

Per cui nel caso dell'ibuprofene essendo l'equazione della retta di taratura $y = 40,886x - 20$ si avrà:

$$C_{ibuprofene} = \frac{424 + 20}{40,886} = 10,9ppm$$

1.7 Esercizi

1) Indicare l'ordine di eluizione dei seguenti composti da una colonna HPLC contenente un impaccamento in fase normale:

- (a) Benzene, dietil etere, n-esano
- (b) Eptano, esanolo, toluene
- (c) Benzene, nitrobenzene, fenolo
- (d) Acetato di etile, acido acetico, dietilammina

2) Quali sono le principali differenze che esistono tra eluizione isocratica e a gradiente di solvente e in quali casi va preferita l'una rispetto all'altra? Per quali tipologie di composti sono maggiormente indicati l'uno e l'altro metodo di eluizione?

1.8 Soluzioni

1) Essendo la colonna a fase normale i composti verranno eluiti in ordine dal meno polare al più polare ovvero secondo il seguente ordine:

- (a) n-esano, benzene, dietiletere
- (b) Eptano, toluene, esanolo
- (c) Benzene, nitrobenzene, fenolo
- (d) Acetato di etile, dietilammina, acido acetico

2) In un'eluizione isocratica la composizione della fase mobile rimane costante durante tutta l'eluizione ed è il metodo più semplice da utilizzare per un HPLC. In una eluizione a gradiente di solvente la composizione della fase mobile viene fatta variare nel tempo e, sebbene sia più complicata da realizzare, rimane la tecnica più adatta per campioni in cui vi sono composti con tempi di ritenzione molto diversi gli uni dagli altri: bisogna infatti tenere a mente il fatto che, per tempi di ritenzione molto lunghi, può esserci uno slargamento dei picchi, con il rischio di perdere informazioni non solo quantitative ma anche qualitative sulle sostanze più saldamente trattenuate dalla fase stazionaria (il rischio è infatti che il segnale si confonda con il rumore di fondo e la sostanza non venga rivelata).

Note

¹McMaster 2007, p. 3

²McMaster 2005, p. 10

³Skoog, p. 916

⁴Skoog, p. 916

⁵Skoog, p. 916

⁶Sadek, p. 40

⁷McMaster 2007, p. 35

⁸McMaster 2007, p. 9

⁹Skoog, p. 917

¹⁰McMaster 2007, p. 5

¹¹McMaster 2007, p. 74

¹²McMaster 2007, p. 82

¹³McMaster 2007, p. 84

¹⁴Sadek, p. 29

¹⁵McMaster 2007, p. 77

¹⁶Skoog, p. 918

¹⁷Skoog, p. 924

¹⁸Sadek, p. 5

¹⁹Sadek, p. 169

²⁰Sadek, p. 169

²¹Skoog, p. 927

²²McMaster 2007, p. 58

²³Skoog, pp. 917-918

²⁴McMaster 2007, p. 71

²⁵Skoog, p. 919

²⁶Skoog, p. 687

²⁷Grotti, p. 162

²⁸Miller, p. 246

²⁹McMaster 2007, p. 122

³⁰Miller, p. 246

³¹Miller, p. 247

Gascromatografia

La gascromatografia è una tecnica analitica complementare alla cromatografia liquida in cui la fase mobile è costituita da un gas che ha solo funzione di trasporto.

Questa tecnica viene utilizzata su sostanze che abbiano una tensione di vapore sufficientemente alta, in modo da garantirne il passaggio in fase gas, e che siano termicamente stabili, per evitare che possano decomporsi per riscaldamento. La temperatura massima di esercizio è limitata non solo dalla stabilità termica degli analiti, ma anche da quella della fase stazionaria che, oltre una certa temperatura, può decomporsi o volatilizzarsi. Questa serie di fattori porta a scegliere temperature di esercizio che possono arrivare fino ad un massimo di circa 300-350 °C.

2.1 Caratteristiche generali

A seconda della fase stazionaria che si va ad utilizzare si possono distinguere due tipi di gascromatografia:

- cromatografia gas-liquido (*GLC - Gas-Liquid Chromatography*) - è la più utilizzata e il suo funzionamento si basa sulla ripartizione degli analiti tra una fase mobile costituita dal gas e una fase liquida supportata su un solido inerte;
- cromatografia gas-solido (*GSC - Gas-Solid Chromatography*) - più di nicchia e con applicazioni molto più limitate il cui funzionamento si basa sul fenomeno di adsorbimento degli analiti sulla superficie della fase stazionaria solida. Il più grande limite associato a questa tecnica cromatografica è legato alla non linearità del processo di adsorbimento che comporta scodamenti importanti dei picchi e che ne rende complessa la riproducibilità, tuttavia viene utilizzata in caso di analiti a basso peso molecolare come solfuro di idrogeno, monossido di carbonio e ossidi di azoto.¹

I vantaggi della gascromatografia sono:

- analisi rapida;
- efficiente, fornisce un'alta risoluzione;
- sensibile, in grado di rivelare anche sostanze presenti nell'ordine dei ppm ma può arrivare talvolta anche ai ppb;
- non distruttiva, il che la rende adatta all'accoppiamento con uno spettrometro di massa;
- molto accurata;
- richiede piccole quantità di campione.

Il problema di questa tecnica è dato dal fatto che gli analiti che si possono analizzare devono essere volatili ma al contempo non devono essere labili termicamente.

Il sistema utilizzato in gascromatografia può essere schematizzato con il seguente schema a blocchi:

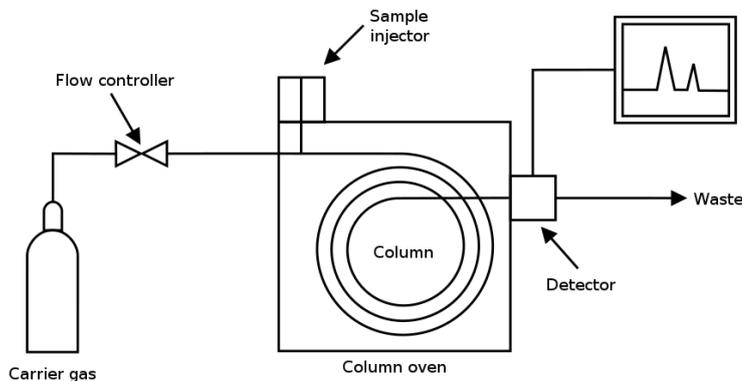


Fig. 2.1: Schema a blocchi di un gascromatografo

2.2 Gas carrier

La fase mobile è costituita da un gas chimicamente inerte: in gascromatografia infatti, la fase mobile non ha azione chimica competitiva con la fase stazionaria ma ha solo funzione di trasporto, per questo motivo si parla di gas carrier. Le molecole interagiscono con la fase stazionaria e vengono trattenute più o meno a lungo a seconda dell'affinità e quindi della forza delle interazioni che questi stabiliranno con essa: più forti le interazioni e più lunghi i tempi di ritenzione. L'energia cinetica delle particelle fa sì che si abbia un continuo scambio di molecole di analita tra fase mobile e fase stazionaria: se un analita si distribuisce prevalentemente nella fase mobile le molecole passeranno più tempo nel gas carrier e quindi saranno trasportate più a lungo attraverso la colonna rispetto a quelle che verranno più stabilmente trattenute dalla fase stazionaria.

A seconda del tipo di rivelatore si utilizzano come fasi mobili: elio, idrogeno e talvolta anche azoto e argon. È estremamente importante che il gas presenti un'elevata purezza perché eventuali impurezze possono andare ad intaccare la fase stazionaria presente nella colonna e distruggerla, compromettendo quindi l'analisi. Tra questi possibili contaminanti troviamo l'acqua che, se presente in tracce, può andare a desorbire altri contaminanti della colonna causando un alto background e talvolta dando picchi fantasma. Un'altra possibile impurezza che va eliminata sono gli idrocarburi che costituiscono un problema importante nel caso si utilizzi un rivelatore a ionizzazione in quanto, dando un alto background, limitano la rivelabilità degli analiti. Dal momento che i gas carrier ad altissima purezza hanno prezzi estremamente elevati, spesso si sceglie di lavorare con gas ad alta purezza e li si purifica prima dell'utilizzo. Le impurezze di acqua e idrocarburi vengono eliminate attraverso l'ausilio di un filtro a setaccio che viene posizionato tra la bombola di gas e il resto della strumentazione, per eliminare l'ossigeno si ricorre invece ad un apposito filtro in quanto è più complicato da rimuovere.

2.3 Controllo del flusso

Dal momento che i gas carrier sono disponibili pressurizzati all'interno di bombole, sono necessari regolatori di pressione, manometri e flussimetri per regolare la velocità e la pressione di ingresso del carrier in colonna. Il controllo della velocità del flusso del gas carrier è infatti necessario per garantire un'adeguata efficienza, riproducibilità e al contempo rendere l'analisi adatta a determinazioni quantitative. Affinché l'analisi sia riproducibile è necessario che la velocità del flusso sia costante in modo tale che anche i tempi di ritenzione siano confrontabili e costanti, questo perché il metodo più semplice per identificare le sostanze è proprio attraverso l'osservazione dei tempi di ritenzione: due sostanze differenti possono avere lo stesso tempo di ritenzione, ma non esiste un composto che abbia due diversi tempi di ritenzione.

La velocità di flusso viene solitamente controllata regolando la pressione del gas carrier in ingresso mediante un riduttore di pressione all'uscita della bombola, dotato poi di un valvola di sicurezza e un filtro di ingresso per impedire ad eventuali particelle contenute nella bombola di entrare in colonna. La pressione del gas all'interno della bombola è circa 2500 psi e questa viene abbassata fino a valori compresi tra 20 e 60 psi² mentre la velocità del flusso viene mantenuta di circa 25-150 mL/min in colonne impaccate e 1-25 mL/min in colonne capillari.³

Dal momento che all'aumentare della temperatura aumenta la viscosità del gas, la velocità del flusso tenderà a diminuire all'aumentare della temperatura, questo aspetto va tenuto bene a mente nel caso di eluizioni a gradiente di temperatura: in questi casi si utilizza un sistema di controllo del flusso di tipo differenziale che consente di mantenere costante il valore di velocità.

In ogni caso si preferisce misurare il flusso attraverso la colonna. Lo strumento più utilizzato è il misuratore a bolla di sapone: questo è costituito da una buretta o da una pipetta graduata attraverso la quale viene fatto passare il gas ed è collegata all'estremità inferiore con un bulbo di gomma contenente una soluzione acquosa di sapone. Quando questo bulbo viene leggermente schiacciato, una bolla di soluzione passa all'interno della buretta: il tempo da questa impiegato per muoversi tra due tacche consente di valutare il valore del flusso volumetrico, che a sua volta può essere messo in relazione con la velocità lineare di flusso attraverso la seguente equazione:⁴

$$F = u_0 A = u_0 \pi r^2$$

con $A \rightarrow$ sezione del tubo

u_0 velocità lineare all'uscita della colonna

Per comodità questo strumento viene posizionato all'uscita della colonna. Sono inoltre disponibili altri strumenti quali flussimetri digitali che misurano il flusso di massa o di volume, oppure entrambi.

2.4 Iniettore

Per avere una buona efficienza cromatografica è necessario che il campione sia di dimensioni adatte e venga introdotto come tappo di vapore, ovvero è necessario che l'iniezione avvenga ad una temperatura sufficientemente elevata da permettere l'istantanea vaporizzazione del campione in modo tale da non avere perdita di efficienza, ma al contempo è necessario che la temperatura sia sufficientemente bassa da evitare la decomposizione termica delle sostanze (per questo motivo infatti solitamente la camera di iniezione è termostata ad una temperatura di circa 50 °C

superiore alla temperatura di ebollizione dell'analita meno volatile).⁵⁶ Dal momento che il volume cresce velocemente al momento della vaporizzazione, è necessario introdurre un volume molto piccolo di campione. Si pensi infatti che un campione di 1 μL di benzene, una volta vaporizzato dà luogo a 600 μL di vapore.⁷ Se si inserisce un volume eccessivo di campione in colonna si rischia di avere bande molto larghe in quanto si inserisce più campione di quello che è realmente in grado di interagire con la fase stazionaria della colonna. Le dimensioni dei campioni variano a seconda del tipo di colonna che viene utilizzata: da pochi decimi di μL a 20 μL per colonne impaccate e volumi anche 100 volte più piccoli per colonne capillari.⁸

A seconda dello stato fisico in cui si presenta il campione e del tipo di analisi che va eseguita, si può ricorrere a diversi tipi di iniettori. Il più semplice metodo di introduzione del campione prevede l'utilizzo di una microsiringa la quale fora un setto di gomma che serve per evitare che, al momento dell'iniezione, i vapori si disperdano.⁹ Il campione così introdotto entra all'interno di un liner, un inserto di vetro inerte e stabile aperto alle due estremità e posto dentro un sistema di riscaldamento. Qui il campione introdotto viene vaporizzato. Le eventuali sostanze non volatili vengono trattenute nel liner e quindi non raggiungono la colonna che altrimenti verrebbe danneggiata: a causa dell'accumulo di queste sostanze al suo interno è infatti necessario sostituire periodicamente il liner. Questo tipo di iniettore è di comune utilizzo per le colonne impaccate e può prevedere un sistema di introduzione con una valvola a loop come quello precedentemente illustrato per l'HPLC.

Un altro tipo di iniettore più complesso, ma molto usato, è l'iniettore **split-splitless** il quale ha due diverse modalità di funzionamento a seconda di come viene suddiviso il volume di vapore ottenuto a seguito dell'iniezione:

- split - solo una piccola parte del volume viene iniettato in colonna;
- splitless - tutto il volume viene iniettato in colonna.

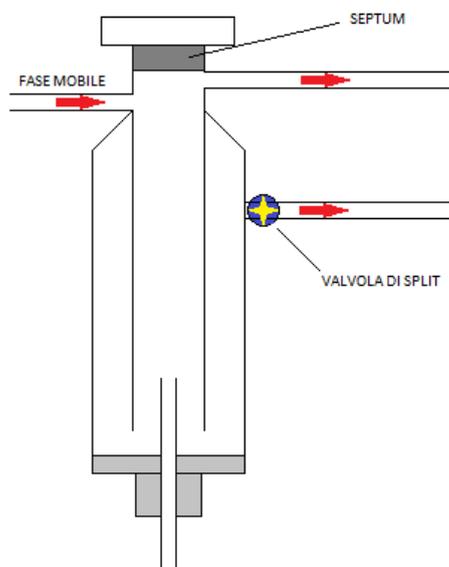


Fig. 2.2: Iniettore split-splitless

Sono presenti diverse valvole che regolano lo split-tagging e il sectum flow. La valvola che si trova nella parte in alto controlla il sectum flow, ovvero il flusso di gas che viene utilizzato per lavare il setto ed è solitamente mantenuta sempre aperta; questo flusso non raggiunge la colonna ma viene scaricato ed allontanato dal sistema prima. È poi presente una valvola di splittaggio che regola il rapporto dei flussi diretti alla colonna e allo scarico. Quando questa valvola è chiusa tutto il gas va in colonna e l'iniezione avviene nella modalità splitless.

Dal momento che nella modalità split solo una parte del campione viene introdotto in colonna, può essere vantaggioso operare in questo modo se il campione è particolarmente sporco o se proviene da matrici complesse: in questo modo si protegge la colonna e se ne evita il deterioramento. Il problema associato a questa pratica è legato al fatto che rende impossibile fare un'analisi quantitativa: innanzitutto il rapporto di split è noto con scarsa precisione e ciò porta a degli errori di grande entità nella determinazione

quantitativa degli analiti, inoltre il campione viene molto diluito, il che rende impossibile l'analisi di componenti in tracce. Un'altra problematica che si ha in questo caso è data dal fatto che la volatilizzazione in questo tipo di iniettore non è istan-

tanea e quindi l'iniezione risulta disomogenea: gli analiti più volatili si vaporizzano per primi e la corsa cromatografica inizia in momenti diversi introducendo un errore importante.

Qualora esigenze particolari portino alla necessità di utilizzare la modalità di iniezione con split, è necessario prima valutare l'entità di questi fattori appena elencati attraverso l'ausilio di standard interni più o meno volatili, il che complica e allunga molto l'analisi.

Un altro tipo di iniettore è l'**on column injector**. Con questo tipo di iniettore il campione viene depositato direttamente in testa alla colonna cromatografica. Questo sistema viene utilizzato quando si ha a che fare con composti che risentono dello stress termico della vaporizzazione split-splitless oppure per sostanze con volatilità troppo diversa e che raggiungerebbero quindi la colonna già parzialmente disperse. L'ago di iniezione deposita il campione in testa alla colonna in condizioni di bassa temperatura, solitamente impostata a valori inferiori alla temperatura di ebollizione del solvente e solitamente, prima di iniziare con l'analisi, il sistema viene raffreddato con circolazione ad aria. È inoltre un metodo adatto all'analisi quantitativa in quanto è nota con accuratezza la quantità di campione introdotta, in più consente di eliminare il problema relativo alla degradazione termica e la discriminazione tra sostanze più e meno volatili all'interno del campione.

Il campione viene depositato direttamente in colonna, questo costituisce un problema soprattutto qualora il campione sia sporco: il primo tratto della colonna si sporca facilmente e si degrada per effetto della matrice, per questo motivo è quindi necessario tagliarne periodicamente qualche centimetro in corrispondenza dell'iniettore o si rischia che le prestazioni della colonna diminuiscano nel tempo. Una soluzione alternativa prevede l'utilizzo di un retention gap, ovvero di un capillare privo di fase stazionaria che raccorda l'iniettore e la colonna e che blocca le sostanze poco volatili facendole condensare sulle sue pareti. Il grande vantaggio di questo iniettore è dato dal fatto che quando la temperatura viene innalzata tutti gli analiti si volatilizzano insieme e la corsa cromatografica parte al tempo zero per tutti: ne consegue quindi che nel cromatogramma si avranno picchi molto stretti.

È inoltre possibile avere un altro tipo di iniezione che sfrutta iniettori particolari che consentono di inserire nello strumento dei supporti nei quali sono stati precedentemente intrappolati gli analiti che vengono rilasciati per desorbimento termico. Questo metodo di iniezione è molto utile nel caso in cui gli analiti siano stati raccolti all'interno di fibre SPME (*Solid Phase Microextraction*).

2.5 Colonna

La colonna costituisce il cuore del sistema cromatografico in quanto è il punto in cui avviene la separazione degli analiti. Dal momento che, affinché avvenga la separazione è necessario che i composti da analizzare siano in fase gas, la colonna è posizionata all'interno di un forno termostato ad una temperatura che varia in base alla natura dei campioni da analizzare. Esistono due tipi di colonne gas cromatografiche:

- colonne impaccate;
- colonne capillari.

Le **colonne impaccate** sono fabbricate con tubi di vetro, metallo o teflon riempite di fase stazionaria solitamente costituita da materiale solido con granulometria inferiore a 200 μm oppure da una fase liquida supportata su particelle solide. Il loro diametro è piuttosto grande e varia dai 2 ai 4 mm e la lunghezza varia tra 1 e 6 metri.¹⁰ Le colonne impaccate, un tempo molto utilizzate, vengono usate ormai solo per

scopi preparativi (consentono infatti di lavorare con quantità relativamente grandi di campione), per le analisi quantitative si preferisce usare le colonne capillari.



Fig. 2.3: Colonna avvolta all'interno di un forno

Le **colonne capillari** sono le più diffuse e le più usate ai giorni nostri. Sono costituite da un tubo capillare di silice fusa ricoperta di polimide che le rende più robuste. Le prime colonne capillari erano costituite di materiali plastici come tygon e nylon, il che comportava diverse limitazioni dal punto di vista della temperatura di esercizio. Per ovviare a questo problema si è quindi passati a realizzare le colonne di metallo, in questo modo si è risolto il problema delle temperature, ma si è introdotto lo svantaggio dell'attività catalitica dei metalli. Si è quindi passati alla realizzazione di colonne in silice fusa.¹¹

La lunghezza è solitamente compresa tra i 10 e i 100 metri e il diametro varia da 0,10 a 0,75 mm.¹² La fase stazionaria è liquida e costituisce il rivestimento interno della colonna, è solitamente spesso pochi decimi di micron. Que-

ste caratteristiche conferiscono alle colonne capillari molteplici punti di forza quali ad esempio: migliore separazione con risoluzione maggiore, tempi di analisi ridotti, sensibilità maggiore e richiedono una minore quantità di campione. Le dimensioni del campione da analizzare costituiscono un aspetto molto importante: è un grande vantaggio nel caso in cui il campione di cui si dispone è molto piccolo, ma costituisce un limite importante e che richiede particolare attenzione. Le colonne capillari infatti rischiano di essere sovraccaricate molto più facilmente proprio perché la quantità di campione che è in grado di interagire con la fase stazionaria è molto piccola: qualora si iniettasse un volume maggiore a quello sopportato dalla colonna si avrebbe la vanificazione dell'analisi. Il piccolo volume che queste sono in grado di gestire unitamente al grande numero di piatti teorici, le rende particolarmente adatte ad impieghi analitici.

Dal momento che le colonne capillari forniscono un'efficienza ed una risoluzione migliore rispetto alle colonne impaccate per i motivi sopra elencati, ne consegue che i picchi sono più stretti e con uno scodamento minore, il che facilita l'analisi rendendo più semplice l'integrazione dei picchi, soprattutto nel caso di analiti presenti in tracce: in questo modo si esegue un errore minore e di conseguenza l'analisi quantitativa, come anche quella qualitativa, risulta essere più affidabile. Il fatto di avere delle bande molto strette infatti, consente di avere un picco con altezza maggiore rispetto a quello ottenibile con un'analisi condotta con una colonna impaccata in cui invece il picco può risultare irrisolto o addirittura confondersi con il rumore di fondo.¹³

Le colonne capillari hanno inoltre un film di fase stazionaria molto più sottile rispetto a quello delle colonne impaccate, il che rende identici i cammini possibili all'interno della colonna e al contempo garantisce il fatto che ogni molecola di soluto possa interagire allo stesso modo e per lo stesso tempo con la fase stazionaria. Nelle colonne impaccate invece, la quantità di fase stazionaria costituente il rivestimento interno della colonna è maggiore, così come lo spessore: all'interno della colonna lo spessore della fase stazionaria non sarà omogeneo ma si avranno delle zone in cui lo spessore è maggiore e altre in cui questo è minore e questo aspetto influirà sui tempi di ritenzione delle componenti degli analiti. Ne consegue quindi una differenza

nella forma dei picchi ottenibili che saranno quindi più larghi nel caso delle colonne impaccate a causa dei fattori che influenzano l'allargamento di banda (vedi).

A seconda del diverso tipo di rivestimento interno si possono distinguere tre diversi tipi di colonne capillari:

- FCOT (*Fused Coated Open Tubular*) - colonna sulle cui pareti interne è presente silice fusa;
- PLOT (*Porous Layer Open Tube*) - colonna cava all'interno sulle cui pareti è adesa una fase stazionaria solida porosa;
- SCOT (*Support Coated Open Tubular*) - sono le colonne capillari maggiormente usate e consistono in una colonna cava all'interno, alle cui pareti è adesa una fase stazionaria liquida supportata su un supporto solido.

Dal momento che in gascromatografia la fase mobile agisce solo come carrier, gli unici fattori che influenzano la separazione sono la temperatura di ebollizione degli analiti e le caratteristiche della fase stazionaria. Aspetto di rilevanza fondamentale quando si tratta di scegliere una fase stazionaria adeguata agli analiti, è la polarità: in genere si segue la regola secondo cui il simile scioglie il simile per cui si userà una fase stazionaria polare contenente gruppi funzionali come -CO, -CN, -OH per analiti polari, mentre colonne con fase stazionaria apolare costituita da idrocarburi e dialchilsilossani per analiti apolari.

Il fattore discriminante per la separazione delle varie sostanze rimane la temperatura di ebollizione: sostanze aventi punti di ebollizione molto differenti tra loro verranno separati da qualsiasi colonna cromatografica indipendentemente dalla fase stazionaria impiegata. Il tipo di fase stazionaria diventa invece un fattore essenziale nel caso in cui le sostanze da separare abbiano punti di ebollizione simili. Aspetto fondamentale da ricordare è che le sostanze utilizzate come fase stazionaria devono avere una bassissima tensione di vapore per evitare il loro movimento in colonna.

Sono possibili due diverse modalità di eluizione:

- eluizione isoterma - la temperatura alla quale si trova la colonna non viene modificata durante l'analisi ma rimane costante per tutto il tempo. È un metodo adatto a sostanze con punti di ebollizione molto simili e in cui la separazione si basa principalmente sulla diversa affinità degli analiti per la fase stazionaria;
- eluizione a gradiente di temperatura - la temperatura alla quale si trova la colonna viene aumentata gradualmente attraverso un programma termico. In questo modo si riescono a separare anche sostanze aventi punti di ebollizione molto diversi, inoltre i tempi di analisi risultano essere più brevi rispetto a quelli di un'eluizione isoterma: con questa modalità infatti si risolve il problema associato a tempi di ritenzione troppo elevati in quanto possono essere abbassati con l'aumento della temperatura. Bisogna infatti ricordare che la tensione di vapore di una qualsiasi sostanza aumenta all'aumentare della temperatura, per cui i soluti tendono a passare nella fase mobile e il loro tempo di ritenzione diminuisce. Per contro all'aumentare della temperatura aumenta anche la viscosità del gas a cui consegue una diminuzione del flusso a parità di pressione in colonna. Questo comporta una variazione della linea di base o la variazione rispetto alla velocità ideale secondo l'equazione di Van Deemter, e quindi il rallentamento dell'analisi con allargamento dei picchi. Per questo motivo si lavora solitamente a flusso costante e non a pressione costante in modo da compensare questi fattori al variare della temperatura. Un altro grande vantaggio è rappresentato dal fatto che un'eluizione a programmata di temperatura consente anche di pulire la colonna da eventuali residui di specie alto

bollenti rimaste dalle iniezioni precedenti, è però necessario evitare di portare la temperatura a valori troppo elevati per non danneggiare la colonna.

Questo tipo di eluizione ha però alcuni limiti di applicazione legati al fatto che gli analiti devono essere stabili termicamente così come la fase stazionaria. In generale altri aspetti da tenere in considerazione sono il fatto che all'aumentare del peso molecolare e della polarità, la volatilità degli analiti diminuisce. Solitamente l'aumento della temperatura è lineare con il tempo.

2.6 Rivelatore

Il rivelatore è lo strumento che reagisce alla presenza di un composto e che in risposta produce un segnale elettrico che viene amplificato e poi registrato. A differenza dei rivelatori usati nella cromatografia liquida questi sono di tipo differenziale e sfruttano quindi la variazione di una proprietà del gas di trasporto e non di una grandezza assoluta.

Dalla colonna cromatografica esce un flusso di sostanze sotto forma di bande discrete le quali hanno un tempo di residenza all'interno del rivelatore relativamente breve, per questo motivo lo strumento deve essere in grado di fornire una risposta in tempi piuttosto rapidi.

Si definisce rumore una componente del segnale priva di informazione analitica legata ad una variazione casuale del valore rivelato dallo strumento causata da fluttuazioni casuali di tutto il sistema di misura. Esistono diversi fattori in grado di generare rumore, quali ad esempio una variazione nella temperatura, impurezze presenti nel gas carrier, fluttuazioni nel flusso di gas, bleeding della colonna oppure la presenza di contaminanti all'interno del rivelatore. Se il rumore di fondo è alto, questo può andare a compromettere la sensibilità del rivelatore e la riproducibilità dell'integrazione. Si possono distinguere tre possibili tipologie di rumore: il rumore a breve termine, quello a lungo termine e da deriva.

- Il rumore a breve termine consiste in perturbazioni della linea di base ad alta frequenza e si presenta sotto forma di picchi più alti rispetto al picco dato dall'analita oggetto di studio. Questa tipologia di rumore può essere facilmente eliminata grazie all'impiego di particolari filtri.
- Il rumore a lungo termine consiste invece in una perturbazione della linea di base di frequenza minore rispetto al caso precedente. Il problema maggiore ad esso legato, e che rende molto difficile riuscire ad eliminarne il contributo, è dato dal fatto che i picchi relativi al rumore a lungo termine sono solitamente di altezza minore o simile a quella del picco di interesse: i picchi risultano quindi essere simili tra loro e per questa ragione difficilmente differenziabili. È solitamente causato da fluttuazioni delle condizioni ambientali quali ad esempio la temperatura, oppure da instabilità di alcune componenti del rivelatore.
- Per quanto riguarda la deriva, questa consiste in variazioni della linea di base molto piccole, lente e costanti nel tempo che non oscurano tuttavia il picco cromatografico di interesse, e può essere causata da fattori quali ad esempio il cambiamento nel flusso del makeup gas oppure il bleeding della colonna.

Un parametro che viene impiegato spesso per valutare l'impatto del rumore è il rapporto segnale/rumore, che è indicativo della probabilità che un particolare picco, in una linea di base affetta da rumore, rappresenti il segnale di un analita.

Dal momento che quasi tutti i rivelatori impiegati nella GC sono distruttivi, non è possibile recuperare il campione dopo averlo analizzato.

Un buon rivelatore deve avere diverse caratteristiche, in particolare deve:

- essere sensibile - avere quindi un buon rapporto tra segnale e quantità di sostanza;
- essere selettivo - rispondere solo ad alcune classi di sostanze;
- avere un ampio intervallo di linearità (LOL) - l'intervallo di concentrazione dell'analita in cui il rivelatore fornisce una risposta linearmente proporzionale deve essere ampio. È infatti fondamentale che il rivelatore lavori all'interno del suo range di linearità affinché fornisca dei valori affidabili: per questo motivo quantità doppie di campione devono restituire un segnale doppio;
- avere bassi LOD - ovvero avere bassi limiti di rivelabilità, il che si riferisce alla quantità minima di soluto che viene rivelata e fornisce un picco sul cromatogramma. Il LOD (*Limit Of Detection*) è definito come: $LOD = \frac{3N}{Su_h}$ e dipende dal rumore (N) e l'altezza del picco (S) e l'ampiezza del picco a mezza altezza u_h .¹⁴
- essere stabile e operativo per lungo tempo;
- fornire una risposta velocemente perché il segnale che registra è transiente;
- avere un ridotto volume morto - per evitare che si verifichi il rimescolamento degli analiti nel tratto che collega il rivelatore e la colonna;
- sopportare elevate temperature per evitare che gli analiti vi condensino all'interno - la temperatura di esercizio deve andare circa da temperatura ambiente fino a 400 °C.

I principali rivelatori impiegati nella gascromatografia sono:

- TCD - *Thermo Conductivity Detector*;
- FID - *Flame Ionization Detector*;
- ECD - *Electron Capture Detector*;
- FPD - *Flame Photometric Detector*;
- MS - *Mass Spectrometry*.

Il **rivelatore a termoconducibilità** è un rivelatore universale e non distruttivo il cui funzionamento si basa sulla differenza di conducibilità termica del gas carrier causata dalla presenza di sostanze nel flusso in uscita dalla colonna. Viene molto spesso utilizzato nella determinazione di sostanze gassose che sono altrimenti difficili da determinare con altri metodi, in particolare è adatto a sostanze inorganiche quali ad esempio NH_3 , CO_2 e H_2O .¹⁵

Questa tipologia di rivelatori utilizza elio o idrogeno come gas carrier in quanto hanno conducibilità maggiore di tutte le sostanze organiche.

All'interno del rivelatore è presente un filo metallico che viene scaldato elettricamente: se il flusso di gas in arrivo è a composizione costante la temperatura del filo metallico sarà costante, quando però all'interno del flusso si trova un analita organico la conducibilità termica diminuisce (le sostanze organiche hanno conducibilità termica minore di quella del gas usato), e quindi la temperatura del filo aumenta. Questa variazione di temperatura provoca uno squilibrio nel circuito con conseguente variazione della resistenza che viene misurata attraverso un ponte di Wheatstone.

In alternativa al filamento metallico può essere usato un termistore, ovvero un resistore la cui resistenza varia significativamente al variare della temperatura. Il più grande vantaggio che questi hanno rispetto ai resistori è che sono inerti all'ossidazione e sono di dimensioni molto ridotte. Per contro però non possono essere impiegati in condizioni riducenti e presentano una serie di altri svantaggi che costituiscono

un limite importante alla loro applicabilità. Un aspetto importante da considerare è che impiegando i termistori la rivelabilità degli analiti diminuisce velocemente all'aumentare della temperatura. Per questo motivo vengono utilizzati solo in analisi a bassa temperatura e con colonne capillari,¹⁶ in quanto consentono di lavorare con volumi molto ridotti. Questo però costituisce un problema importante perché, come si vedrà in seguito, tale tipo di rivelatore non è particolarmente sensibile se confrontato con gli altri esistenti.

In generale per quanto riguarda il rivelatore TCD, sia esso a termistore o a resistore, il segnale ottenuto è proporzionale alla concentrazione degli analiti. Si tratta tuttavia di un rivelatore non specifico in quanto risponde ad ogni tipo di composto e universale, perché ogni composto modifica la conducibilità termica del flusso di gas in modo differente: per questo motivo è necessaria una standardizzazione. Viene infatti spesso aggiunto uno standard interno, che apporta importanti vantaggi all'analisi: innanzitutto le temperature della cella e del filamento sono rese indipendenti le une dalle altre, inoltre il risultato fornito è reso indipendente dal tipo di rivelatore (se a filamento o a termistore), dalla corrente misurata, dalla concentrazione del campione e dal flusso del gas carrier. Come si è già accennato in precedenza anche la sensibilità è molto ridotta, una delle peggiori se confrontata con quella degli altri rivelatori: tollera infatti un rumore fino a $2 \mu\text{V}$, ha una rivelabilità compresa tra 10^6 e 10^8 g/mL nel gas carrier e il LOD è nell'intorno dei 10 ppm; in compenso il LOL è piuttosto ampio in quanto nell'ordine di 10^4 .¹⁷

Per minimizzare le fluttuazioni termiche il rivelatore viene posizionato all'interno di un blocco metallico dotato di grande inerzia termica che viene mantenuto ad una temperatura di circa $50 \text{ }^\circ\text{C}$ maggiore di quella della colonna: è infatti molto importante controllare la temperatura in quanto si possono registrare variazioni di resistenza significative al variare della temperatura. La variazione della resistenza del filamento varia con la temperatura con la seguente relazione:

$$R_1 = R_0[1 + \alpha(T_1 - T_0)]$$

con α ; coefficiente termico che dipende dal materiale. Si possono trovare strumenti a singolo o a doppio canale. Nel primo caso è necessario avere un sistema di correzione per le variazioni di temperatura, nel secondo invece si confrontano i due filamenti di cui uno esposto ad un flusso di una colonna di un bianco e l'altro al flusso uscente dalla colonna di analisi. Il secondo caso è ovviamente il preferibile in quanto consente di compensare non solo le variazioni di temperatura del forno ma anche il fenomeno di bleeding.

Il **rivelatore a ionizzazione di fiamma** è un rivelatore adatto pressoché ad ogni sostanza organica. Richiede un'elevatissima purezza del gas carrier, del combustibile e del comburente impiegato nella fiamma ma la sua risposta non è influenzata da piccole variazioni di pressione, temperatura e velocità del flusso. Non risente inoltre di impurezze eventualmente presenti all'interno del gas carrier quali ad esempio CO_2 o acqua. In compenso anche piccolissime tracce di idrocarburi possono andare ad intaccare la stabilità della linea di base.¹⁸ Il FID è costituito da una fiamma alimentata da idrogeno ed aria che sono rispettivamente il combustibile e il comburente. Quando il flusso contenente gli analiti raggiunge la fiamma si ha la combustione con formazione di nuove specie cariche. A seguito della ionizzazione di queste specie si ha il rilascio di elettroni che, una volta usciti dalla fiamma, incontrano un campo elettrico che viene applicato tra due elettrodi. Gli elettroni quindi si dispongono in virtù dell'effetto del campo elettrico e vengono raccolti e conteggiati all'elettrodo collettore: si crea così una corrente elettrica tra i due elettrodi che è proporzionale alla

concentrazione degli analiti che l'hanno generata. È inoltre presente un amplificatore che ha il compito di amplificare il segnale registrato.

Il segnale è proporzionale al numero di atomi di carbonio presenti nella specie rivelata e non al suo peso o al suo numero di moli.¹⁹ La risposta che viene fornita dal rivelatore è influenzata dalla presenza di eteroatomi quali ossigeno, zolfo e alogeni in quanto, essendo elettronegativi, possono catturare parte degli elettroni rilasciati durante la combustione e possono causare l'abbassamento della corrente di fondo.

L'elettrodo collettore di elettroni è solitamente di forma cilindrica in modo da massimizzare la superficie disponibile alla collezione di elettroni. Il FID fornisce una miglior risposta se si usa azoto come make up gas, soprattutto nel caso si utilizzi una colonna capillare. È molto importante mantenere la temperatura controllata all'uscita della fiamma del rivelatore o il rischio è che l'acqua condensi nuovamente e torni verso la fiamma causando cortocircuiti: per questo motivo la temperatura del rivelatore viene mantenuta più alta rispetto a quella della colonna in modo tale da non avere la condensazione delle sostanze. Si deve comunque prestare attenzione al fatto che la temperatura non sia troppo elevata o il rischio è che le superfici solide costituenti lo stesso rivelatore emettano elettroni per ionizzazione termoionica. Il surriscaldamento del rivelatore può inoltre causare perdite elettriche causando instabilità nella corrente.

È un rivelatore molto specifico e dotato di una stabilità moderata. Il range di linearità si estende fino a 10^7 , è dotato di bassi LOD, 10^{-13} gC/s²⁰ ma necessita di un gas carrier puro, in particolare privo di idrocarburi in modo da diminuire il rumore di fondo che rischia di essere molto alto essendo questo strumento molto sensibile alla presenza di atomi di C.²¹

Il **rivelatore a cattura di elettroni** è un rivelatore specifico e non distruttivo, particolarmente adatto a piccole quantità di analita e quindi molto sensibile.

il rivelatore ECD²² sfrutta una sorgente radioattiva di ^{63}Ni che emette particelle beta. Queste colpendo il gas di trasporto lo ionizzano e producono così un flusso di elettroni che restituiscono un valore di corrente che viene misurata tramite due elettrodi. In assenza di analiti tale processo di ionizzazione genera una corrente costante, ma se nell'eluato sono presenti analiti elettron attrattori ovvero molecole organiche contenenti gruppi funzionali con alogeni, azoto, fosforo, doppi legami coniugati o organometalli, la corrente diminuisce proporzionalmente alla concentrazione degli analiti presenti.²³ Al posto del ^{63}Ni si può anche impiegare del trizio che presenta però diverse problematiche a livello operativo: innanzitutto può essere usato solo a temperature inferiori a 225 °C (mentre il Ni può arrivare fino a 400 °C),²⁴ in più può essere facilmente contaminato da composti che possono adsorbirsi sulla superficie della lamina affievolendo la sorgente di raggi x. Altro aspetto da tenere in considerazione è che ad elevate temperature il trizio emette radiazioni ad un livello tale da costituire un pericolo per la salute umana.²⁵ Questi importanti svantaggi vengono però compensati da un importante vantaggio: la forza di ionizzazione del trizio è molto più elevata di quella del nichel, il che comporta un flusso di radiazioni maggiori a cui consegue una ionizzazione del gas di trasporto più efficiente.

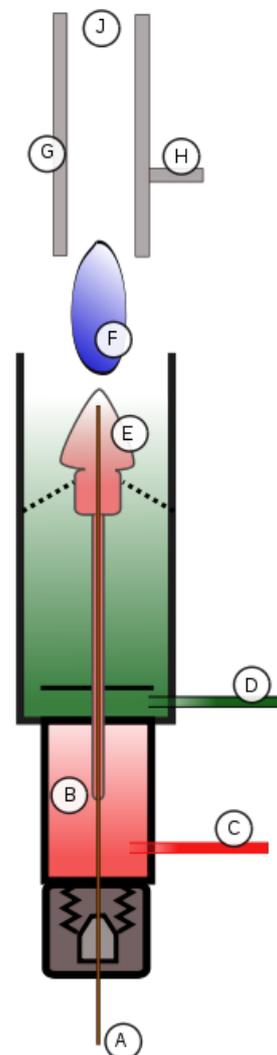


Fig. 2.4: Rivelatore a ionizzazione di fiamma

Solitamente viene usato azoto come gas carrier e talvolta argon invece che elio o idrogeno in quanto è più facilmente ionizzabile avendo una sezione trasversale di ionizzazione maggiore, inoltre viene spesso aggiunto un make up gas per migliorare le prestazioni.²⁶

La differenza di potenziale può essere applicata in modi differenti: come tensione costante, corrente costante a frequenza pulsata variabile oppure corrente costante a frequenza pulsata costante.

La tensione ad impulsi riduce significativamente l'accumulo di zone cariche nel rivelatore risultante da differenze nella velocità degli ioni carichi positivamente rispetto alla mobilità degli elettroni liberi. Gli elettroni dotati di una certa energia termica, quando non è presente alcun tipo di impulso, si attaccano a qualsiasi specie elettronegativa e vengono prodotti ioni carichi negativamente. Gli ioni negativi così ottenuti si combinano con quelli positivi presenti causando una diminuzione della corrente: per questo motivo è necessario regolare in modo molto accurato il periodo di impulso o si rischia di andare a perdere l'informazione relativa alle specie cariche positivamente annullate dalla combinazione con quelle negative. Solitamente l'impulso è nell'ordine dei 30-50 V e viene ripetuto ogni 10 μs .²⁷

Esigenza fondamentale è l'elevatissima purezza del gas di trasporto in quanto qualsiasi specie elettronegativa eventualmente presente causa un abbassamento della corrente. In ogni caso è comunque consigliabile l'utilizzo di standard interni ed esterni. Vista la sua elevata sensibilità e dati i limiti di rivelabilità molto bassi in particolare per alogeni, zolfo, fosforo e nitrogruppi (arriva a rivelare quantità nell'ordine di picogrammi e talvolta femtogrammi), viene spesso utilizzato in ambito biomedico e ambientale.

Il **rivelatore fotometrico a fiamma** è un tipo di rivelatore che viene utilizzato per la rivelazione di composti e metalli contenenti zolfo o fosforo quali ad esempio stagno, boro, arsenico e cromo.

Il suo funzionamento si basa sul monitoraggio dell'intensità dell'emissione luminosa di specie dopo che queste sono state eccitate attraverso l'ausilio di una fiamma idrogeno/aria. Gli analiti presenti nel campione vengono indirizzati alla fiamma dove vengono decomposti e portati allo stato eccitato. Le specie così ottenute emettono luce con una lunghezza d'onda caratteristica. La radiazione viene prima fatta passare attraverso un filtro che seleziona una lunghezza d'onda, dopodiché l'intensità viene amplificata e poi rivelata con un tubo fotomoltiplicatore.

Il rumore aumenta all'aumentare della temperatura di esercizio per cui la temperatura del rivelatore deve essere impostata ad un valore tale da impedire la ricondensazione delle sostanze nel rivelatore. Per questo motivo la temperatura di esercizio di questo rivelatore è di circa 150-275 °C.²⁸

La sensibilità dipende dall'intensità della luce emessa dalle specie analizzate ed aumenta al diminuire della temperatura della fiamma. Altri aspetti che possono andare ad aumentare la sensibilità del rivelatore sono l'utilizzo di gas carrier come elio o idrogeno, in quanto dotati di alta conducibilità termica, e l'utilizzo di una fiamma ricca di idrogeno che però rappresenta un problema perché rende la fiamma instabile. L'intervallo di linearità è nel caso del fosforo di circa 10^4 e per lo zolfo 10^3 .²⁹

Un altro rivelatore che viene spesso usato in GC è lo spettrometro di massa che risulta essere un accoppiamento vincente in quanto consente di restituire informazioni sulla natura degli analiti separati e permetterne anche l'identificazione. È per questo che si parla di accoppiamento GC-MS. Alla trattazione di questo argomento verrà però riservato un capitolo nella sezione successiva.

2.7 Esempio di applicazione

Nell'esempio qui riportato si vedrà come la gascromatografia possa essere applicata alla determinazione quali-quantitativa di idrocarburi lineari. La metodologia analitica impiegata prevede una separazione GC e rivelazione tramite FID.

Viene fornito un campione contenente un analita incognito da identificare e di cui determinare la concentrazione. Vengono preparate delle soluzioni standard a concentrazione nota e crescente delle seguenti specie: $C_{10}H_{22}$, $C_{11}H_{24}$, $C_{12}H_{26}$, $C_{13}H_{28}$. Per identificare l'analita presente nel campione in esame si confronta il tempo di ritenzione ottenuto dall'analisi cromatografica del campione incognito con i tempi di ritenzione delle specie delle varie soluzioni standard, avendo cura di mantenere inalterate le condizioni operative durante tutte le analisi.

L'analisi delle varie soluzioni standard a concentrazione 30 ppm ha riportato i seguenti risultati:

Analita	Tempo di ritenzione [min]
$C_{10}H_{22}$	3,454
$C_{11}H_{24}$	4,048
$C_{12}H_{26}$	4,630
$C_{13}H_{28}$	5,186

Si è quindi eseguita l'analisi sul campione incognito che ha portato ai seguenti risultati:

Campione	Tempo di ritenzione [min]	Area analita [mAU*s]	Area media [mAU*s]
Replica 1	3,462	6116	6225
Replica 2	3,457	6333	

Andando a confrontare i valori ottenuti nel campione con quelli delle soluzioni standard analizzate si può quindi affermare che l'analita presente nel campione in esame è $C_{10}H_{22}$.

Per quanto riguarda la determinazione della concentrazione dell'analita si procede costruendo la retta di taratura sulle aree dei picchi del $C_{10}H_{22}$ a diverse concentrazioni. I risultati ottenuti sono i seguenti:

	Tempo di ritenzione [min]	Area [mAU*s]
Std 10 ppm	3,454	3792
Std 20 ppm	3,451	8827
Std 30 ppm	3,454	13279
Std 40 ppm	3,454	18098

Andando a riportare i dati sopra riportati in un grafico con l'area del picco in funzione della concentrazione si ricava la retta di taratura del tipo $y = mx + q$, dove y è l'area del picco e x la concentrazione. Dal grafico risulta che l'equazione della retta è $y = 473,7x - 843,5$.

Essendo l'area del picco relativo al campione pari a 6225, andando a sostituire tale valore nell'equazione della retta è possibile ricavare la concentrazione:

$$C_{\text{decano}} = \frac{6225 + 843,5}{473,7} = 14,9\text{ppm}$$

Note

¹Skoog, pp. 887-909

²Miller, p. 17

³Skoog, p. 888

⁴Skoog, p. 866

⁵Skoog, p. 889

⁶Miller, p. 25

⁷Miller, p. 20

⁸Skoog, p. 889

⁹Sadek, p. 177

¹⁰Skoog, p. 899

¹¹Grob, pp. 110-111

¹²Skoog, p. 899

¹³Grob, p. 112

¹⁴Grob, p. 283

¹⁵Sadek, p. 198

¹⁶Grob, p. 295

¹⁷Sadek, p. 5

¹⁸Grob, p. 298

¹⁹Grob, p. 300

²⁰Grob, p. 303

²¹Sadek, p. 81

²²Sadek, p. 62

²³Sadek, p. 62

²⁴Grob, p. 307

²⁵Grob, p. 307

²⁶Grob, p. 307

²⁷Grob, p. 308

²⁸Grob, p. 328

²⁹Grob, p. 328

Spettrometria di massa e accoppiamento GC-MS

La spettrometria di massa è una tecnica analitica che studia gli ioni in fase gas e che consente di identificare i componenti presenti all'interno di una miscela, determinarne il peso molecolare ed eseguire analisi quantitative. È una tecnica che presenta un'ampia applicabilità grazie alle sue caratteristiche intrinseche: può essere usata su campioni sia organici che inorganici e consente di eseguire analisi sia qualitative che quantitative,¹ per questo motivo le aree di interesse sono estremamente vaste e vanno dalla farmacologia alle scienze ambientali alla biologia e molte altre ancora.

3.1 Caratteristiche generali

Il principio che è alla base del funzionamento dello spettrometro di massa è la separazione di ioni in fase gas in base al loro rapporto massa/carica, che vengono poi inviati ad un rivelatore che converte l'abbondanza dei singoli ioni in un segnale elettrico.²

Per quanto concerne i limiti di rivelabilità associati a questa tecnica sono molto bassi e spesso inferiori a 1 ppb nel caso della spettrometria di massa atomica,³ è poi una tecnica caratterizzata da un ampio range di applicabilità in quanto è possibile determinare ioni aventi peso molecolare fino a 10^8 Da.⁴

Un grande limite legato a questa tecnica è che non è in grado di separare composti diversi, per questo motivo viene infatti accoppiata ad una tecnica separativa come la cromatografia liquida o la gascromatografia. Ovviamente, essendo differenti le condizioni operative richieste da queste due tecniche bisognerà utilizzare un adeguato sistema di interfaccia che consenta ai due strumenti di lavorare insieme.

La strumentazione che viene impiegata per la spettrometria di massa può essere schematizzata nel seguente modo:

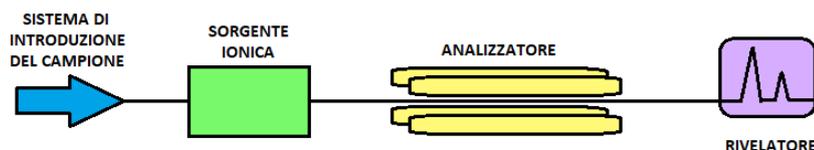


Fig. 3.1: Schema a blocchi di uno spettrometro di massa

3.2 Sistema di introduzione del campione

Il campione può essere introdotto sotto diverse forme, potendo trovarsi allo stato solido, liquido o gas; per questo motivo questa tecnica si presta bene ad essere accoppiata sia alla cromatografia liquida che alla gascromatografia. Aspetto critico è quello di creare un'interfaccia adeguata che consenta di mantenere l'alto vuoto all'interno della strumentazione: lo spettrometro di massa infatti lavora ad alto vuoto in modo tale da minimizzare gli urti tra gli ioni di analita generati e altre particelle in fase gas presenti. Se così non fosse gli ioni generati non raggiungerebbero il rivelatore a causa dell'elevata temperatura presente all'interno dello strumento e della reattività intrinseca degli ioni. Per queste ragioni il sistema di introduzione del campione è quindi il punto critico dell'accoppiamento delle due tecniche e deve garantire la corretta introduzione del campione senza compromettere il vuoto del sistema.

3.3 Sorgente ionica

È il sistema all'interno del quale avviene la ionizzazione degli ioni. A seconda del metodo utilizzato per la loro generazione si avranno due diversi tipologie di sorgenti:

- Ionizzazione hard - la quantità di energia che viene fornita alle molecole di analita è molto elevata. La ionizzazione utilizzata in questo caso è detta ionizzazione elettronica e si ottiene bombardando l'analita con un fascio di elettroni.
- Ionizzazione soft - la quantità di energia che viene fornita alle molecole di analita è sufficiente alla sola ionizzazione.

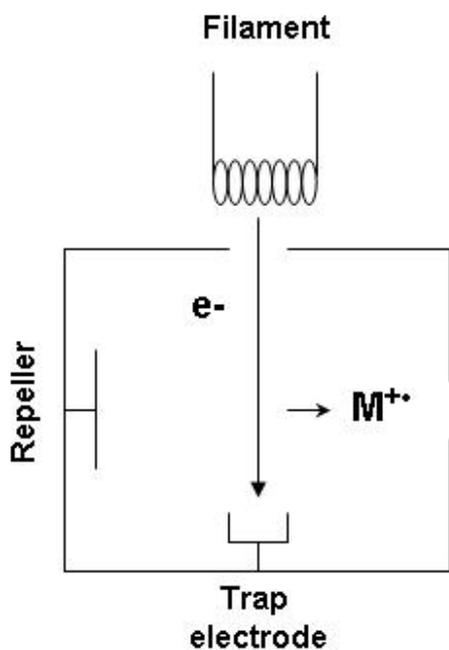


Fig. 3.2: Esempio di figura immersa nel testo

La sorgente a ionizzazione elettronica (*EI - Electron Ionization*), può essere applicata solamente a campioni in fase gas, per questo motivo viene solitamente usata nel caso si abbia a che fare con analiti sufficientemente volatili. La sorgente è costituita da un filamento di tungsteno o rodio il quale emette elettroni perpendicolarmente rispetto alla direzione di avanzamento del campione. Il fascio di energia proveniente dal filamento è solitamente di 70 eV che è una quantità molto più elevata di quella necessaria per la sola ionizzazione del campione. Quando le molecole di analita incontrano il fascio di elettroni ad alta energia si ionizzano a seguito degli urti con gli elettroni e si generano quindi ioni positivi. Gli ioni positivi così generati vengono quindi accelerati da un sistema di lenti a potenziale crescente: in questo modo i cationi vengono spinti verso l'analizzatore mentre i pochi ioni negativi che si sono generati vengono accelerati verso il repeller. Tutte le specie in uscita dalla sorgente hanno energia cinetica per via dell'accelerazione delle lenti a potenziale crescente.

La quantità di anioni che viene generata con questa tipologia di sorgente è molto piccola: la loro formazione è infatti sfavorita e porta ad un rapporto

ioni positivi/negativi di circa 10.000/1. Per quanto riguarda invece il rapporto tra il numero di molecole inserite e in numero di molecole ionizzate utilizzando un fascio di elettroni di 70 eV questo è di circa 1/1000.

A causa dell'elevata energia del fascio di elettroni che viene utilizzato, oltre alla ionizzazione si ha anche la frammentazione degli analiti in specie più piccole e il cui schema di frammentazione dipende dalla natura chimica della specie così come la sua tendenza a frammentarsi. Ogni evento di frammentazione da luogo alla formazione di due o più specie chimiche di cui una sola sarà carica, le altre invece saranno neutre: la carica elettrica totale si conserva, per cui solamente la specie carica sarà rivelabile dallo strumento, le specie neutre infatti non raggiungeranno neanche il rivelatore. Frammenti identici formati da percorsi di frammentazione differenti daranno un unico segnale la cui intensità sarà data dalla somma delle intensità dei singoli ioni.

Si lavora con un fascio di elettroni da 70 eV perché se si operasse ad energie maggiori si avrebbe una frammentazione eccessiva dell'analita e sarebbe quindi molto più complicato risalire alla struttura della sostanza da cui si è generato. Ad energie inferiori invece si avrebbe una ionizzazione molto ridotta che porterebbe alla generazione di un numero troppo piccolo di ioni, il che sarebbe poco funzionale per l'analisi qualitativa: 70 eV è quindi un valore che costituisce un buon compromesso tra questi due effetti.

3.4 Analizzatore

L'analizzatore di massa è un dispositivo che è in grado di distinguere gli ioni in funzione del loro rapporto massa su carica (m/z).

La capacità di uno spettrometro di massa di distinguere tra masse è definita in termini di risoluzione:⁵

$$R = \frac{m}{\Delta m}$$

con $m \rightarrow$ massa nominale del primo picco

$\Delta m \rightarrow$ differenza tra le masse dei due picchi adiacenti.

A seconda del tipo di impiego la risoluzione richiesta ad uno spettrometro di massa può anche essere molto diversa. nel caso in cui si abbia a che fare con ioni aventi la stessa massa nominale è necessario avere un analizzatore con una risoluzione molto alta, di diverse migliaia. Qualora invece gli ioni da discriminare abbiano masse molecolari che differiscono le une dalle altre per almeno un'unità di massa, la risoluzione richiesta dallo strumento sarà ovviamente minore rispetto al caso precedente.⁶

A seconda del principio alla base del funzionamento possiamo distinguere i seguenti tipi di analizzatore:

- a settore magnetico;
- quadrupolare;
- a tempo di volo.

L'**analizzatore a settore magnetico** è il primo ad essere stato inventato, è molto costoso e voluminoso. È costituito da un magnete curvo e il suo funzionamento si basa sulla deviazione che ogni particella carica in movimento subisce dalla sua traiettoria rettilinea in seguito all'applicazione di un campo magnetico ad essa perpendicolare.

La deviazione nella traiettoria che lo ione subisce è espressa dalla seguente equazione:⁷

$$\frac{m}{z} = \frac{B^2 r^2}{2V_s}$$

con r → raggio di curvatura del magnete;

B → campo magnetico;

v_s → potenziale di accelerazione.

Dalla seguente formula si evince che il raggio di curvatura del magnete che lo ione deve attraversare nel suo tragitto influisce in modo direttamente proporzionale al rapporto m/z selezionato. Mantenendo costante il potenziale di accelerazione l'unico fattore che incide sulla selezione del rapporto m/z è il campo elettrico applicato, per questo motivo variando lentamente nel tempo il valore che questo assume, si riesce ad ottenere la separazione degli ioni.

L'**analizzatore quadrupolare** è formato da quattro elettrodi a sezione circolare o iperbolica a due dei quali viene fornita carica positiva, mentre ai restanti due carica negativa. I due elettrodi aventi stessa carica sono messi agli antipodi e collegati tra loro affinché il potenziale applicato sia identico. Ad una coppia di elettrodi viene poi applicato un potenziale continuo mentre all'altra si applica un potenziale alternato oscillante a radiofrequenze.

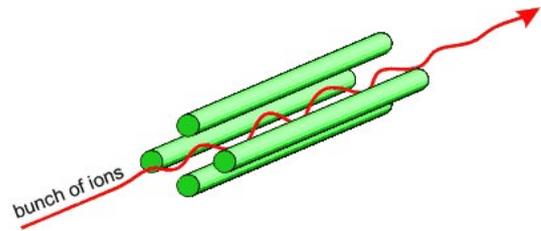


Fig. 3.3: Analizzatore di massa a quadrupolo

Il potenziale totale generato dal quadrupolo, ovvero il campo che va ad agire sugli ioni, è in definitiva un campo oscillante che viene descritto dalla seguente espressione:

$$V_{tot} = V_{cont} + V_{alt} \cos \Omega t$$

con Ω = frequenza angolare del campo alternato ($rad s^{-1}$)

Per eseguire l'analisi si va ad incrementare il valore di tensione continua e alternata applicata in modo tale che il rapporto V_{cost}/V_{alt} rimanga costante. Con l'opportuna regolazione delle tensioni infatti, viene creato un percorso stabile solamente per ioni aventi un determinato rapporto m/z : questi saranno in grado di descrivere la traiettoria sinusoidale necessaria per arrivare fino al rivelatore, gli altri invece verranno eliminati lungo il percorso in quanto descriveranno oscillazioni di ampiezza via via crescente, per cui procedendo lungo il percorso andranno a collidere contro una delle sbarre costituenti un elettrodo. Lo spettro di massa viene quindi ottenuto scansionando le tensioni che vengono applicate agli elettrodi.

Il tempo necessario per eseguire la scansione completa è piuttosto breve, inoltre la capacità di trasmissione è elevata. Uno dei più grandi svantaggi è costituito dal fatto che la risoluzione è piuttosto bassa, il che la rende adatta ad analisi in accoppiata con cromatografia liquida o gascromatografia, ma non alla rivelazione di ioni con massa superiore ai 1000 Da.

L'**analizzatore a tempo di volo** (*TOF - Time Of Flight*) è formato da un lungo tubo percorso da ioni precedentemente accelerati da una differenza di potenziale.

Dal momento che l'energia cinetica di uno ione è definita come:

$$E_{cin} = \frac{mv^2}{2}$$

dove m è la massa dello ione e v la sua velocità.

Ma allo stesso tempo dipende dal potenziale di accelerazione applicato e dalla stessa carica dello ione come descritto dalla seguente equazione:

$$q = ze,$$

dove q è carica totale.

Unendo le informazioni ricavabili dalle precedenti equazioni si ricava che la velocità di uno ione che lascia la sorgente è uguale a:⁸

$$v = \sqrt{\left(\frac{2zeV_{acc}}{m}\right)}$$

dove V_{acc} è il potenziale di accelerazione che subisce lo ione.

Si consideri che il tempo necessario allo ione per coprire la distanza d che lo separa dal rivelatore è definito come $t = \frac{d}{v}$ per cui andando a sostituire il valore di velocità precedentemente ottenuto nella formula qui riportata del tempo si ricava che:

$$t = \sqrt{\frac{m}{z} \left(\frac{d^2}{2V_{acc}e}\right)}$$

Dalla precedente formula si evince che il tempo impiegato dagli ioni per percorrere una distanza fissa verso il rivelatore è inversamente proporzionale alla massa degli ioni stessi. Per questo motivo ioni con basso valore m/z arrivano al rivelatore più velocemente di quelli con elevato valore m/z : a parità di carica saranno gli ioni più leggeri a raggiungere per primi il rivelatore.

Affinché la separazione sia utile è necessario che tutti gli ioni partano contemporaneamente dalla sorgente ionica, in questo modo tutti gli ioni aventi lo stesso rapporto m/z arriveranno contemporaneamente al rivelatore e tutti gli ioni vengono rivelati in sequenza a seconda del valore del loro rapporto massa/carica.

Gli analizzatori a tempo di volo sono in generale strumenti semplici e robusti, dotati di un intervallo di masse rivelabili praticamente illimitato e i tempi di analisi sono piuttosto brevi: il tempo di acquisizione di uno spettro di massa completo è nell'ordine dei μs .⁹ Il loro più grande limite è però dato dal fatto che sono caratterizzati da risoluzione e sensibilità piuttosto basse se confrontate con quelle di altri analizzatori, questo perché il numero di ioni che viene rivelato è molto piccolo.

La risoluzione dell'analizzatore a tempo di volo si ricava facendo alcune considerazioni in merito al rapporto m/z e il tempo di volo. Innanzitutto si isola il rapporto m/z :

$$\frac{m}{z} = \left(\frac{2eV_{acc}}{d^2}\right)t^2$$

Da cui si ricava che:

$$\frac{1}{z}dm = \left(\frac{2eV_{acc}}{d^2}\right)2tdt$$

E quindi:

$$\frac{m}{dm} = \frac{t}{2dt}$$

Da cui si evince che la risoluzione dell'analizzatore a tempo di volo è pari a:

$$R = \frac{m}{\Delta m} = \frac{t}{2\Delta t} = \frac{d}{2\Delta x}$$

con m e t rispettivamente massa e tempo di volo dello ione;

Δt l'ampiezza a mezza altezza dei picchi;

d la distanza percorsa dallo ione;

Δx lo spessore di un pacchetto di ioni che arriva al rivelatore.

Dal momento che la risoluzione è proporzionale al tempo di volo e al percorso, per migliorare la risoluzione è possibile agire in due modi:

- Allungare il tubo dell'analizzatore in modo da allungare il cammino che ogni ione deve compiere per arrivare al rivelatore – in questo modo però si aumenta la perdita di ioni a causa della loro collisione con le molecole di gas;
- Abbassare la tensione di accelerazione per aumentare il tempo di volo, questo comporta però l'abbassamento della sensibilità.

È quindi necessario trovare un adeguato compromesso che consenta di avere una buona risoluzione e sensibilità, questo viene fatto utilizzando un tubo lungo 1-2 metri e usando una tensione di accelerazione di 20 kv.¹⁰

3.5 Rivelatore

I rivelatori utilizzati nella spettrometria di massa sono strumenti in grado di generare una corrente elettrica la cui intensità è proporzionale all'abbondanza degli ioni incidenti. Ne esistono di diverse tipologie e la scelta di uno rispetto ad un altro dipende dal tipo di applicazione analitica che si svolge e dalla geometria della strumentazione. Dal momento che il numero di ioni che superano l'analizzatore è solitamente piuttosto piccolo, è spesso necessaria un'amplificazione del segnale. Il primo rivelatore impiegato nella spettrometria di massa è il **piatto fotografico**. Il suo funzionamento si basa sul fatto che gli ioni con lo stesso rapporto m/z raggiungono la piastra nello stesso punto: in questo modo è possibile rivelare simultaneamente un vasto numero di ioni con rapporto massa/carica differente. L'abbondanza relativa dei singoli ioni viene invece stimata sulla base dell'oscurità delle macchie che rimangono impresse sulla lastra fotografica. Questo metodo di rivelazione consente di avere un valore di abbondanza ovviamente approssimativo, per questo motivo è ormai in disuso.

Un'altra tipologia di rivelatore è a **coppa di Faraday** il quale è costituito da una coppa metallica o cilindrica con un piccolo foro la quale è collegata a terra con un resistore. Gli ioni che riescono a raggiungere l'interno del cilindro vengono neutralizzati attraverso la donazione o acquisizione di elettroni dalle pareti del rivelatore contro cui impattano: questo processo di scarica produce un passaggio di corrente che viene amplificata e rivelata. Questa tipologia di rivelatore presenta innumerevoli fonti di errore, tra queste ad esempio la presenza di elettroni secondari i quali vengono generati nel momento in cui un elettrone impatta contro la parete del rivelatore: se non vengono eliminati per tempo vengono rivelati dal rivelatore falsando il segnale. È quindi necessario adottare un adeguato sistema di cattura di

elettroni oppure adottare delle accortezze per ridurne la produzione o impedirne la rivelazione. Una soluzione può essere realizzata ricoprendo le pareti del rivelatore con carbone, in quanto produce un minor numero di elettroni secondari. Anche la forma della coppa di Faraday è estremamente importante: infatti, insieme all'utilizzo di un campo magnetico debole impedisce agli elettroni secondari di uscire ed essere rivelati. Questa serie di fattori incide soprattutto sulla sensibilità (che è piuttosto ridotta) e sulla bassa velocità di risposta. Il rivelatore più comunemente usato è il **moltiplicatore di elettroni a dinodi discreti** il cui principio di funzionamento è analogo a quello di un tubo fotomoltiplicatore. Gli elettroni e ioni che arrivano dall'analizzatore vengono fatti impattare contro un catodo di Cu-Be generando elettroni secondari i quali a loro volta vengono indirizzati e accelerati verso il dinodo successivo il quale viene mantenuto ad una tensione positiva sempre più elevata. Il numero di dinodi può variare da 12 fino a 20 unità.¹¹

Un'altra variante di questa tipologia di rivelatore è il **moltiplicatore di elettroni a dinodo continuo** in cui i dinodi discreti sono sostituiti da un dinodo continuo di forma solitamente a corno, le cui pareti sono costituite da vetro drogato Pb.^{12,13} La differenza di potenziale viene applicata lungo tutto il rivelatore. Gli elettroni e gli ioni entrano nel rivelatore dalla parte dell'apertura maggiore, impattano contro la superficie del tubo e generano elettroni secondari che vengono accelerati verso l'uscita del rivelatore:

prima di arrivare alla fine della sua lunghezza però impatteranno più volte con le pareti amplificando il segnale per effetto cascata. L'elevato fattore di amplificazione che si può ottenere in entrambi i casi (circa 10^7)¹⁴ e la velocità di risposta di questo rivelatore lo rendono estremamente adatto. L'unica problematica è legata al fatto che il fattore di rivelazione dipende fortemente dalla velocità di impatto degli ioni rivelati così come dalla loro massa e carica, per questo motivo l'efficienza di rilevamento è molto inferiore per ioni con elevato m/z e per ioni molto lenti. L'utilizzo dei dinodi discreti e l'applicazione di un potenziale via via crescente aiuta ad accelerare gli ioni cosicché si riesca ad ottenere una buona efficienza di rilevamento anche per gli ioni più lenti. In particolare il moltiplicatore a dinodi discreti viene impiegato per la rivelazione di ioni ad alta massa e a bassa energia cinetica.

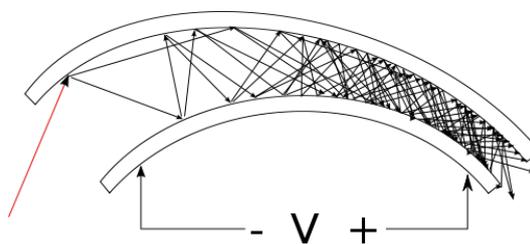


Fig. 3.4: Moltiplicatore di elettroni

3.6 Accoppiamento GC-MS

L'utilizzo dello spettrometro di massa come rivelatore per la gascromatografia presenta molti vantaggi:

- è estremamente specifico nella selezione di ioni da quantificare;
- è uno dei rivelatori più sensibili in assoluto;
- è estremamente versatile.

L'idea dell'accoppiamento nasce dal fatto che queste due tecniche svolgono funzioni analitiche complementari: la gascromatografia consente la separazione di miscele complesse, mentre la spettrometria di massa consente la caratterizzazione e la quantificazione dei composti.¹⁵ Il problema legato all'accoppiamento di queste due tecniche è legato alle differenti condizioni operative richieste, che portano alla necessità di creare di un'interfaccia adeguata che permetta di far lavorare insieme i due strumenti: innanzitutto la colonna cromatografica lavora sotto pressione, mentre lo

spettrometro di massa lavora in alto vuoto. Inoltre il flusso delle colonne cromatografiche, soprattutto quelle impaccate, è molto importante e per niente trascurabile, soprattutto in ambito di cromatografia liquida. Un altro aspetto estremamente importante nasce dalla necessità di operare una scansione molto velocemente: gli analiti devono essere rivelati non appena escono dalla colonna o il rischio è quello di vanificare la separazione, in più l'eventuale spurgo della colonna crea molti problemi.

La prima cosa da fare per creare un'interfaccia adeguata è quella di impoverire il campione proveniente dalla colonna cromatografica di fase mobile in modo da ridurre il flusso in arrivo allo spettrometro di massa, pratica particolarmente importante nel caso di colonne impaccate che utilizzano importanti volumi di fase mobile. Un'interfaccia molto usata prevedeva l'utilizzo di un tubo vetro poroso all'interno del quale veniva fatto passare il flusso in uscita dalla colonna. Il tubo di vetro veniva quindi sottoposto all'esterno all'alto vuoto, il che forzava il gas carrier, solitamente elio, ad uscire dal tubo il quale era dotato di pori di dimensioni tali da permettere solo il passaggio del gas carrier ma non dell'analita: si sfruttava infatti le ridotte dimensioni dell'elio che è il gas carrier più usato. Il problema principale era però dovuto al fatto che una quantità non trascurabile di analita veniva comunque persa (circa il 20-50%).¹⁶ Dal momento che si è passati all'impiego di colonne capillari, questa tipologia di interfacce non è più necessaria in quanto queste colonne hanno un flusso che è già abbastanza ridotto da essere compatibile con la portata richiesta dallo spettrometro di massa. L'unica accortezza che va fatta è legata al mantenimento di una temperatura adeguata: si utilizza infatti una piccola sezione di tubo riscaldato al termine della colonna che serve ad evitare la ricondensazione delle sostanze che sono state separate con la cromatografia in modo quindi che si mantengano in fase gas al momento dell'iniezione nello spettrometro, il che causerebbe l'allargamento dei picchi o anche la cattura di sostanze altobollenti che non arriverebbero quindi allo spettrometro di massa.¹⁷

Come in gascromatografia c'è il rischio della degradazione termica degli analiti, motivo per il quale il controllo termico è di fondamentale importanza: è per questo che la temperatura di iniezione è solitamente non eccessivamente alta. Va inoltre tenuto a mente che gli eventuali prodotti di degradazione termica possono essere identificati durante l'analisi con uno spettrometro di massa. Per prevenire la degradazione termica degli analiti viene solitamente utilizzato l'iniettore on column.

Dal momento che la degradazione di alcune componenti può anche essere causata dalla presenza di gruppi silaniolici della superficie del vetro del liner di iniezione, una buona soluzione è costituita dall'impiego di agenti silanizzanti che convertono i gruppi silanolicci in eteri trimetilsililici.¹⁸

Un altro aspetto che va ben tenuto in considerazione al momento dell'accoppiamento di queste due tecniche è legato alla portata del flusso che può essere sopportato dallo spettrometro di massa, il che costituisce un elemento limitante. Questo è solitamente di circa 1 mL/min, anche se può essere leggermente più alto se si usano accortezze particolari. In linea generale vengono quindi impiegate colonne dal diametro da 0,25 mm o tuttalpiù da 0,32 mm, non è però possibile usare colonne megabore in quanto hanno dimensioni eccessive.¹⁹ L'iniezione non rappresenta comunque un fattore limitante in quanto vanno bene sia iniettori split-splitless in entrambe le modalità, sia gli on column injector. Le considerazioni fatte nelle sezioni precedenti riguardo ai criteri di scelta si applicano allo stesso modo. Unico aspetto da controllare è che le connessioni tra i due siano a tenuta stagna per evitare perdite di pressione che possono inficiare sul corretto funzionamento dello strumento. Quando possibile è preferibile usare l'iniettore split-splitless in modalità split per evitare la contaminazione da solventi delle pompe da vuoto. L'unico caso in cui l'iniettore

split-splitless in modalità split è da evitare è nel caso in cui l'analita da analizzare sia presente in tracce in quanto il rischio è quello di perderne una quantità importante e non riuscire quindi a rivelarlo. Dal momento che nelle iniezioni in modalità splitless il campione viene iniettato tal quale, per proteggere la colonna da ostruzioni o contaminazioni causate da sostanze eventualmente presenti nel flusso di analita oggetto di analisi, viene utilizzato spesso un setto rivestito di materiale adsorbente, la cui funzione è proprio quella di intrappolare tali sostanze, non volatili e polari.²⁰

Un altro problema nell'accoppiamento di queste due tecniche è dato dal fatto che, mentre il rivelatore analogico tradizionale misura una proprietà del gas in arrivo ed è quindi in grado di fornire un segnale continuo, lo spettrometro di massa esegue singole scansioni ad intervalli. Per avere un cromatogramma adeguato è quindi necessario avere un elevato numero di scansioni in un breve lasso di tempo e di avere quindi scansioni estremamente rapide: in questo modo infatti, avendo un elevato numero di punti sul grafico, è possibile approssimare il picco in modo adeguato e quantificare l'area sottesa efficacemente.

Un ultimo ma non meno importante problema è dato dal fenomeno di spurgo della colonna: mano a mano che la temperatura aumenta durante l'eluizione a gradiente di temperatura, la fase stazionaria costituente l'impaccamento della colonna tende a disgregarsi ed a lasciare frammenti che reggiungono lo spettrometro di massa e vengono quindi rivelati causando l'innalzamento della linea di base del cromatogramma. Questo fenomeno è difficile da evitare ma può essere ridotto scegliendo una fase stazionaria sufficientemente stabile. Tutto ciò che viene inserito nella colonna cromatografica entra e viene rivelato dallo spettrometro di massa, eccezion fatta per le componenti del campione che rimangono trattenute in colonna. Per i componenti volatili non si pone alcun tipo di problema dal momento che, al termine dell'analisi, vengono poi pompati via tramite il sistema di vuoto ma, nel caso in cui si abbia a che fare con materiali semi volatili, o ancora peggio non volatili, la situazione assume un'importanza ben diversa: queste componenti possono depositarsi nella fonte di ioni dello spettrometro di massa, diminuendone la sensibilità e portando ad aver bisogno di una maggior manutenzione. Per evitare queste spiacevoli conseguenze si ricorre all'eliminazione di queste sostanze in modo da preservare lo spettrometro di massa. I composti inorganici non volatili possono essere rimossi per scambio ionico o tramite estrazione, mentre i composti organici e polari tramite gel di silice o fluorisil. Dal momento eseguire queste eliminazioni richiede la manipolazione del campione, bisogna eseguire questi metodi con molta attenzione e solo se realmente necessario in quanto il rischio è quello di avere una perdita involontaria di una parte di analita. Anche in GC-MS si può ricorrere alla derivatizzazione delle molecole di campione con lo scopo di migliorare la simmetria del picco, la volatilità e la stabilità termica di un dato componente per migliorarne la separazione gas cromatografica o anche per consentire di avere una migliore selettività e limiti di rivelabilità nell'analisi spettrofotometrica. A tale scopo il metodo che viene comunemente utilizzato prevede la derivatizzazione di uno o più atomi di idrogeno attivi (ovvero degli idrogeni appartenenti a un gruppo $-OH$, $-COOH$, $-NH_2$, ecc.) attraverso una serie di reattivi come ad esempio N,O-bis(trimetilsilil)acetammide oppure bis(trimetilsilil)frifluoroacetammide.²¹ In questo modo tale idrogeno viene sostituito con un gruppo trimetilsilil modificando la massa del composto che verrà quindi rivelato a valori maggiori nello spettro di massa.

Altro aspetto da tenere a mente nell'accoppiamento di queste due tecniche è la scelta del solvente: deve essere compatibile con entrambe e non deve dare picchi di interferenza, per questo motivo si deve selezionare un solvente che non fornisca picchi che ricadano nell'intervallo m/z di interesse nell'analisi.

3.7 Esempio di applicazione

La metodologia analitica che prevede l'accoppiamento GC-MS è, come abbiamo visto nel corso di questo capitolo, una tecnica estremamente efficace nella separazione e determinazione di analiti in matrici anche molto complesse. In questa sezione verrà proposta la costruzione di un metodo analitico che prevede la determinazione quantitativa degli IPA in un campione di sedimento marino utilizzando la tecnica accoppiata GC-MS usando come riferimento il metodo analitico ufficiale dell'ISS.²²

Gli idrocarburi policiclici aromatici sono prodotti derivati dalla combustione incompleta e la pirolisi di materia organica e la loro determinazione è estremamente importante in quanto 16 di loro presentano attività cancerogena (naftalene, acenaftilene, acenaftene, fluorene, fenantrene, antracene, fluorantene, pirene, benzo[a]antracene, crisene, benzo[a]fluorantene, benzo[k]fluorantene, benzo[a]pirene, indeno[1,2,3-c,d]pirene, di-benzo[a,h]antracene, benzo[g,h,i]perilene).

La loro presenza viene monitorata per

valutare l'impatto ambientale che i processi umani hanno e per farlo tale analisi viene eseguita su matrici diverse (acqua, sedimenti..). Per prima cosa bisogna andare a definire quelle che sono le condizioni di esercizio per entrambe le tecniche e costruire un'interfaccia che funzioni. Per quanto riguarda la gascromatografia si sono usati i seguenti parametri:

- colonna apolare Phenomenex ZB-5 (fenilmetilsilossano al 5
- iniettore on-column;
- volume di iniezione 0,5 μL ;
- gas carrier costituito da He a flusso costante di 1,4 mL/min;
- programmata di temperatura come in figura.

Per quanto riguarda invece i parametri usati per la spettrometria di massa abbiamo:

- energia degli elettroni impostata a 70 eV;
- temperatura del transfer line di 280 °C;
- temperatura della sorgente di 250 °C;
- temperatura del quadrupolo di 100 °C.

È poi di necessaria importanza avere a disposizione uno standard certificato contenente i 16 composti da monitorare che verranno poi analizzati nelle condizioni sopra riportate così da ottenerne i tempi di ritenzione: questo ci consentirà di identificare i vari composti presenti nel campione attraverso il semplice confronto dei tempi di ritenzione ed eseguire così l'analisi qualitativa. Per l'analisi quantitativa si esegue invece una scansione SIM (ovvero *Selected Ion Monitoring* - scansione che consente di monitorare solo una piccola quantità di rapporti m/z corrispondenti a ioni rappresentativi dell'analita) su ioni scelti opportunamente per ciascun analita. Prima di eseguire questa tipologia di analisi è prima necessario eseguire una calibrazione: in questo caso si propone il metodo di diluizione isotopica, un sistema di

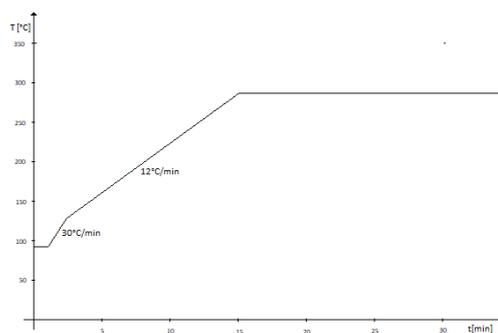


Fig. 3.5: Programmata temperatura

standard interno che prevede l'aggiunta al campione di una concentrazione nota di analita deuterato.

Si costruisce quindi la retta di taratura preparando più soluzioni standard a concentrazione crescente e ponendo sull'asse delle ordinate il rapporto tra le aree di analita e di standard interno e sull'asse delle ascisse il rapporto delle concentrazioni delle stesse, in questo modo è infatti possibile anche tenere conto dell'efficacia della procedura di estrazione degli analiti dalla matrice iniziale.

Ottenuta quindi la retta di taratura del tipo $y = mx + q$ si ricava la concentrazione di analita (espressa in ppb) con la seguente formula:

$$C_{analita} = \left(\frac{\left(\frac{A_{analita}}{A_{std.int.}} - q \right)}{m} \right) * C_{std.int.}$$

A questo punto, noto il volume iniettato e nota la massa del campione analizzato si ricava la concentrazione dell'analita espressa in ng/g :

$$C_{analita} = \frac{C_{analita(ppb)} * volume(mL)}{massa_{campione}}$$

Note

¹Skoog, p. 802

²Skoog, p. 804

³Skoog, p. 811

⁴Hoffmann, p. 9

⁵Skoog, p. 805

⁶Skoog, p. 805-806

⁷Hoffmann, p. 144

⁸Hoffmann, p. 126

⁹Hoffmann, p. 127

¹⁰Hoffmann, p. 129

¹¹Hoffmann, p. 177

¹²Skoog, p. 807

¹³Hoffmann, p. 178

¹⁴Skoog, p. 807

¹⁵Herbert, p. 253

¹⁶Grob, p. 346

¹⁷Grob, p. 347

¹⁸Grob, p. 347

¹⁹Grob, p. 346

²⁰Grob, p. 346

²¹Grob, p. 345

²²E. Menichini e G. Viviano (a cura di), Gruppo di lavoro Istituto Superiore di Sanità "Metodiche per il rilevamento delle emissioni in atmosfera da impianti industriali", *Determinazione degli idrocarburi policiclici aromatici (IPA). Metodo gascromatografico*, Rapporti ISTISAN 97/35, settembre 1997, ISSN 1123-3117. <https://www.osti.gov/etdweb/servlets/purl/618097>

Cromatografia a fluido supercritico

La cromatografia a fluido supercritico è una tecnica ibrida tra cromatografia liquida e gascromatografia che ha alcune delle migliori caratteristiche di entrambe e prevede l'utilizzo di un fluido supercritico come fase mobile. Si definisce fluido supercritico un liquido che viene portato in condizioni di temperatura tali da superare il punto critico ovvero un punto tale per cui non è possibile più riottenere la sostanza in fase condensata qualsiasi sia la pressione applicata. In tali condizioni le proprietà chimico-fisiche del fluido sono intermedie tra quelle di un liquido puro e quelle di un gas: questo ha densità e coefficiente di diffusione simili a quelli di un liquido e viscosità simili a quelle di un gas. Nella tabella vengono riportati e messi a confronto i diversi valori approssimati di alcuni importanti parametri cromatografici:¹²

	Densità (g/mL)	Viscosità (g/cm s)	Diffusibilità (cm^2/s)
GAS	10^{-3}	10^{-4}	0,1
SFC	0,2-0,8	$5 \cdot 10^{-4}$	10^{-4}
LIQUIDO	1	10^{-2}	10^{-5}

Per portare una sostanza in condizioni di fluido supercritico si vanno ad aumentare i parametri di pressione e temperatura fino ad arrivare al punto critico. Quando temperatura e pressione di un liquido sono a valori prossimi a quelli ambiente si possono distinguere nettamente due fasi: una liquida e una gassosa sovrastante. Quando si raggiungono i valori critici la distinzione tra le due fasi scompare e si ottiene una fase omogenea che viene definita fluido supercritico.

4.1 Caratteristiche generali

La cromatografia a fluido supercritico può essere definita come una tecnica ibrida tra HPLC e GC, infatti presenta notevoli vantaggi rispetto ad entrambe. I fluidi supercritici hanno minore viscosità rispetto ai liquidi per cui le analisi saranno più veloci e si avrà una minor caduta di pressione lungo la colonna (la caduta di pressione assume valori che vanno da 1/3 a 1/5 rispetto a quelli ottenibili con l'analisi HPLC). Questo consente di impiegare colonne più lunghe rispetto a quelle usate in cromatografia liquida e che possono arrivare anche a 10-20 metri di lunghezza e con diametri interni di 50-100 μm^3 senza provocare un'eccessiva contropressione.⁴ Un altro aspetto particolarmente interessante è che, essendo le colonne più lunghe, il numero di piatti teorici sarà maggiore e questo porterà ad avere un potere risolutivo

fino a 5 volte maggiore rispetto a quello ottenibile con l'HPLC. Altro grande vantaggio che ne consegue è la possibilità di collegare più colonne in serie per ottenere un'efficienza ancora maggiore.

Dal momento che il fattore discriminante è la densità della fase mobile e non la temperatura come nel caso della gascromatografia, questa tecnica può essere applicata anche a sostanze termolabili, l'unica accortezza da avere è assicurarsi che la temperatura necessaria a mantenere la fase mobile in condizioni supercritiche sia cautelativamente più bassa della temperatura di degradazione della sostanza in esame. Proprio perché questa tecnica non richiede il passaggio in fase gas degli analiti può essere applicata a sostanze poco volatili e quindi si presta bene per analisi su soluti ad alto peso molecolare altrimenti non analizzabili con gascromatografia. La viscosità e la diffusività intermedie tra un gas e un liquido consentono di avere una separazione più veloce per i motivi già visti prima ma al contempo un allargamento di banda minore rispetto a quello osservabile in gascromatografia: l'elevata velocità di diffusione degli analiti nella fase mobile costituita dal gas carrier dà infatti luogo a fenomeni di allargamento di banda molto importanti.

4.2 Strumentazione

La strumentazione utilizzata in cromatografia a fluido supercritico può essere così schematizzata:

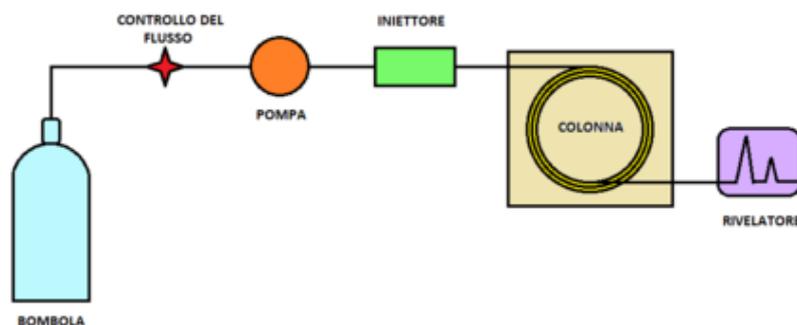


Fig. 4.1: Schema a blocchi della cromatografia a fluido supercritico

È inoltre presente un restrittore ovvero un capillare di lunghezza variabile tra i 2 e i 10 cm la cui funzione è quella di mantenere la pressione della colonna ai valori desiderati: si lavora infatti con un gas compresso e che deve rimanere in condizioni di supercriticità per tutta l'analisi. A seconda della tipologia di rivelatore impiegata viene collocato in punti diversi della strumentazione:

- tra la colonna e il rivelatore se il rivelatore è un rivelatore da GC, in questo modo il fluido supercritico viene fatto passare allo stato gassoso prima di entrare nel rivelatore;
- dopo il rivelatore se il rivelatore impiegato è un rivelatore per cromatografia liquida, in questo caso la fase mobile deve essere mantenuta in condizioni di supercriticità anche nel rivelatore.

Altro aspetto molto importante è che i blocchi costituenti iniettore, colonna e rivelatore devono trovarsi all'interno di un forno termostato a temperatura controllata: è infatti necessario avere un sistema che consenta di avere un accurato controllo della temperatura. La fase mobile deve essere infatti mantenuta in condizione di fluido supercritico.

4.3 Fase mobile

Come fase mobile la più comunemente usata è la CO₂, questo perché presenta un punto critico facilmente raggiungibile: la temperatura critica è infatti 31 °C e la pressione critica di 72,9 atm. Dal momento che le condizioni richieste per ottenere la CO₂ in condizioni supercritiche sono non troppo stringenti, l'apparecchiatura solitamente utilizzata è la stessa impiegata per l'HPLC.

Presenta inoltre una serie di altri vantaggi, quali ad esempio:

- è un eccellente solvente per molte molecole organiche non polari - le interazioni intermolecolari tra le molecole di CO₂ sono molto deboli a temperatura e pressione ambiente (la CO₂ infatti è un gas in condizioni standard). Se le molecole di CO₂ vengono compresse e quindi obbligate a stare le une vicine alle altre la densità aumenta, ciononostante le interazioni intermolecolari rimangono di debole entità, il che rende possibile ad altre molecole di diffondersi attraverso e questo conferisce alla CO₂ un buon potere solvente;
- è compatibile con molti rivelatori;
- è atossica, non infiammabile;
- poco costosa - viene solitamente riciclata da industrie in cui viene ottenuta come sottoprodotto di reazione;
- è trasparente all'UV.

Si possono poi aggiungere dei modificatori organici polari che hanno effetto sulla ritenzione e modificano il potere solvente, tra questi troviamo ad esempio il metanolo: bisogna infatti tenere conto che anche la polarità, insieme alla densità, agisce sulla separazione degli analiti. L'aggiunta di modificatori diventa poi indispensabile quando si ha a che fare con soluti molto polari le cui interazioni con la fase stazionaria sono molto intense, in questi casi infatti spesso vengono trattenuti così saldamente in colonna da venir eluiti con difficoltà e restituendo picchi slargati, oppure non venir eluiti affatto. Possono essere usate diverse specie organiche come modificatori ma il più usato è il metanolo in quanto presenta una miscibilità completa con la CO₂ insieme ad altri vantaggi quali ad esempio il basso costo e la bassa tossicità. Qualora la sola aggiunta di metanolo non fosse sufficiente ad aumentare la polarità della CO₂ fino ai valori desiderati, si può ricorrere all'aggiunta di acqua: questa non è solubile se non in piccolissime quantità (circa 1%) nella CO₂ pura, ma se al solvente si aggiunge del metanolo, la quantità di acqua tollerata può arrivare anche fino al 10

Come fase mobile si possono impiegare anche altre sostanze quali ad esempio N₂O, pentano, diclorodifluorometano, miscele di isopropile ed etere dietilico, ma la CO₂ è sicuramente la più usata. In cromatografia a fluido supercritico esistono diversi modi per intervenire sui tempi di ritenzione e sulla selettività:

- concentrazione del modificatore - è il metodo più efficace e consente di ottenere il miglior effetto sui tempi di ritenzione pur influenzando solo in piccola parte sulla selettività;
- temperatura - la variazione di temperatura consente di ottenere un effetto molto minore sui tempi di ritenzione, in compenso però agisce sulla posizione relativa dei picchi;
- pressione - è l'aspetto che influisce maggiormente se si ha a che fare con la CO₂ pura ma questo parametro diventa di secondaria importanza soprattutto nel caso in cui la concentrazione del modificatore assuma valori piuttosto alti. Dal momento che la densità della fase mobile, unitamente con l'affinità dell'analita per questa, varia al variare della pressione, questa proprietà viene controllata

attraverso un sistema regolatore di pressione: la densità però aumenta all'aumentare della pressione in modo non lineare, per questo motivo sono presenti dei software in grado di controllare la programmata di densità e renderla lineare. Lavorando ad una temperatura costante di 40 °C, le maggiori variazioni nella densità della CO₂ si verificano in un range di pressione compreso tra 70 e 110 bar, se ne deduce quindi che, per piccole variazioni di pressione all'interno di questa finestra, si otterranno grandi variazioni di densità e quindi di potere solvente della CO₂.⁵

- velocità del flusso - ad un incremento della velocità del flusso corrisponde l'aumento della pressione che, come visto in precedenza, agisce significativamente sull'analisi. L'aumento di pressione causa un aumento della densità e una diminuzione dei tempi di ritenzione.

4.4 Applicazioni

Le colonne utilizzate per la SFC sono le stesse impiegate nell'HPLC, la più comunemente usata prevede come fase stazionaria C18, particolarmente indicata per trigliceridi, oli di silicone, carotenoidi e altri composti contenenti lunghe code apolari.⁶

Viene molto spesso impiegata per la separazione di composti chirali, per questo motivo è molto usata in ambito farmaceutico: si pensi infatti al fatto che il 40% dei farmaci in uso sono costituiti da sostanze chirali e che 1/4 di queste vengono somministrate in forma enantiomericamente pura.⁷ Trova comunque anche molte altre applicazioni nell'industria alimentare: si pensi alla decaffeinizzazione di tè e caffè o anche all'estrazione di aromi dal luppolo per la produzione di birra.

È una tecnica che si presta bene ad essere accoppiata ad ogni tipo di rivelatore e lo spettrometro di massa non fa eccezione, in questo caso saranno necessarie delle accortezze per realizzare un'interfaccia opportuna. L'accoppiamento viene realizzato attraverso l'ausilio di un tubicino di acciaio inossidabile di 125-250 μm che andrà ad aumentare il volume morto causando un lieve slargamento dei picchi, ma provocherà un effetto particolarmente favorevole: il calo di pressione provocherà la vaporizzazione di una buona parte della fase mobile e di conseguenza il flusso in arrivo al rivelatore sarà molto minore (il che è estremamente positivo dal momento che uno dei problemi principali legato all'utilizzo dello spettrometro di massa è proprio dato dal fatto che è in grado di tollerare solo portate ridotte di flussi in entrata).

Il più grande limite di questa tecnica è dato dalle condizioni di temperatura e pressione richiesti per mantenere la fase mobile in condizione di fluido supercritico: richiede infatti una strumentazione molto costosa aggiungendo un buon numero di fattori da controllare ed ottimizzare.

Note

¹Miller, p. 124

²Skoog, p. 752

³Skoog, p. 938

⁴Webster, p. 19

⁵Berger, p. 21

⁶Berger, p. 35

⁷Webster, p. 2

Bibliografia

- *Chromatography, Concepts and Contrasts*, James M. Miller, John Wiley & Sons, 2005
- *Fondamenti di chimica analitica*, Skoog e West, III edizione, EdiSES, 2015
- *Metodi spettroscopici per l'analisi elementare*, M. Grotti, ARACNE editrice, 2012
- *HPLC - A Practical User's Guide*, M. C. McMaster, Wiley Interscience, 2007
- *Illustrated Pocket Dictionary of Chromatography*, P. C. Sadek, Wiley Interscience, 2005
- *Basic Gas Chromatography*, H. M. McNair & J. M. Miller, John Wiley & Sons, 2009
- *Mass Spectrometry: Principles and Applications*, E. de Hoffmann e V. Stroobant, John Wiley & Sons, 2007
- *Modern Practice of Gas Chromatography*, R. L. Grob e E. F. Barry, Wiley Interscience, 2004
- *Supercritical Fluid Chromatography*, Terry A. Berger, Agilent Technologies, 2015
- *Supercritical Fluid Chromatography: Advances and Applications in Pharmaceutical Analysis*, Gregory K. Webster, Pan Stanford Publishing, 2014

Elenco delle immagini

Introduzione

- 1 Giuli2797 / Creative Commons Attribuzione-Condividi allo stesso modo 4.0 Internazionale. Fonte:
https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Colonna_clorofilla.png
- 2 Giuli2797 / Creative Commons Attribuzione-Condividi allo stesso modo 4.0 Internazionale. Fonte:
https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Tempo_morto.png
- 3 Klaas1978 / pubblico dominio. Fonte:
https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Rt_5_9.png
- 4 Quantumkinetics / Creative Commons Attribuzione-Condividi allo stesso modo 3.0 Unported. Fonte:
<https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Emg.png>
- 5 Giuli2797 / Creative Commons Attribuzione-Condividi allo stesso modo 4.0 Internazionale. Fonte: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Separazione_di_due_sostanze_-_modello_a_piatti_teorici.png
- 6 Giuli2797 / Creative Commons Attribuzione-Condividi allo stesso modo 4.0 Internazionale. Fonte: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Diffusione_longitudinale.png
- 7 Pronchik / GNU Free Documentation License / Creative Commons Attribuzione-Condividi allo stesso modo 4.0 Internazionale. Fonte:
https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Van_Deemter_equation.png

Cromatografia liquida

- 1.1 Kkmurray / Creative Commons Attribuzione-Condividi allo stesso modo 3.0 Unported / GNU Free Documentation License. Fonte:
https://commons.wikimedia.org/wiki/File:LC_schematic.gif
- 1.2 Giuli2797 / Creative Commons Attribuzione-Condividi allo stesso modo 4.0 Internazionale. Fonte:
https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Pompa_a_siringa.png
- 1.3 Giuli2797 / Creative Commons Attribuzione-Condividi allo stesso modo 4.0 Internazionale. Fonte: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Pompa_alternativa_reciprocante_a_singola_testa.png
- 1.4 Giuli2797 / Creative Commons Attribuzione-Condividi allo stesso modo 4.0 Internazionale. Fonte: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Pompa_alternativa_reciprocante_a_doppia_testa.png

- 1.5 Giuli2797 / Creative Commons Attribuzione-Condividi allo stesso modo 4.0 Internazionale. Fonte: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Valvola_commutativa_-_carico.png
- 1.6 Giuli2797 / Creative Commons Attribuzione-Condividi allo stesso modo 4.0 Internazionale. Fonte: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Valvola_commutativa_-_iniezione.png

Gas Cromatografia

- 2.1 Offnfopt / pubblico dominio. Fonte: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Gas_chromatograph-vector.svg
- 2.2 Giuli2797 / Creative Commons Attribuzione-Condividi allo stesso modo 4.0 Internazionale. Fonte: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Iniettore_split-splitless.png
- 2.3 Polimerek / GNU Free Documentation License / Creative Commons Attribuzione-Condividi allo stesso modo 4.0 Internazionale, 3.0 Unported, 2.5 Generico, 2.0 Generico e 1.0 Generico. Fonte: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:GC_Oven_inside.jpg
- 2.4 Mattj63 / pubblico dominio. Fonte: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Flame_Ionization_Detector.svg

Spettrometria di massa e accoppiamento GC-MS

- 3.1 Giuli2797 / Creative Commons Attribuzione-Condividi allo stesso modo 4.0 Internazionale. Fonte: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Schema_a_blocchi_MS.png
- 3.2 Anzhela016 / Creative Commons Attribuzione 3.0 Unported. Fonte: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Schematic_diagram_of_an_EI_ion_source.jpg
- 3.3 Mkotl / GNU Free Documentation License / Creative Commons Attribuzione-Condividi allo stesso modo 3.0 Unported. Fonte: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Quadrupole_en.gif
- 3.4 Egmason / Creative Commons Attribuzione-Condividi allo stesso modo 3.0 Unported. Fonte: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Electron_multiplier.svg
- 3.5 Giuli2797 / Creative Commons Attribuzione-Condividi allo stesso modo 4.0 Internazionale. Fonte: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Programmata_temperatura.png

Cromatografia a fluido supercritico

- 4.1 Giuli2797 / Creative Commons Attribuzione-Condividi allo stesso modo 4.0 Internazionale. Fonte: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Schema_a_blocchi_SFC.png