

GASCROMATOGRAFIA



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

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

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

I meccanismi di separazione relativi alla GC sono sostanzialmente due: ripartizione e adsorbimento: il primo nel caso che la fase stazionaria sia liquida, il secondo quando è solida.

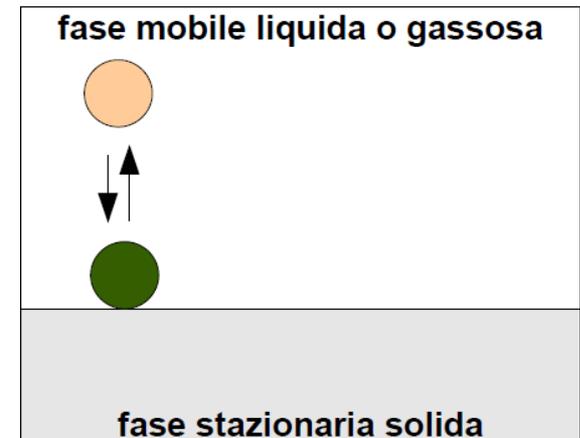
CROMATOGRAFIA DI ADSORBIMENTO

La fase stazionaria è un solido. Si basa sul fatto che alcuni materiali solidi hanno la capacità di trattenere le molecole alla loro superficie - sono coinvolte forze di interazione deboli, quali forze di Van der Waals e legami a idrogeno.

I diversi analiti si ripartiscono tra fase mobile e fase stazionaria (adsorbente) in modo diverso a seconda delle relative forze di interazione. Queste dipendono dalla natura chimica dell'adsorbente, della fase mobile e degli analiti.

La forza di legame di un analita dipende da specifici gruppi funzionali (-OH e aromatici aumentano le interazioni).

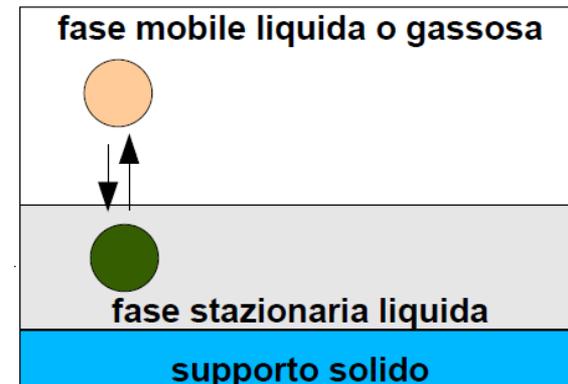
Un tipico adsorbente è la **silice**, che presenta gruppi silanolo (Si-OH). Altri adsorbenti comunemente usati sono **allumina** (ossido di alluminio) e **carbone**. La cromatografia di adsorbimento può essere condotta sia su strato sottile (TLC) che su colonna (HPLC). È il metodo più comunemente usato per la separazione di composti non ionici, insolubili in acqua, quali trigliceridi, vitamine, vari farmaci.



CROMATOGRAFIA DI RIPARTIZIONE

La fase stazionaria è un liquido che impregna un solido granulare inerte o è ad esso chimicamente legato; in questo liquido le molecole da separare sono solubili; la fase stazionaria e la fase mobile devono invece essere immiscibili. Durante l'eluizione le molecole si ripartiscono dinamicamente tra le due fasi secondo la diversa solubilità di ognuna. Si parla quindi di cromatografia di ripartizione, che può essere gas-liquido o liquido-liquido a seconda della natura della fase mobile. Le due tecniche che ad oggi sfruttano il principio della ripartizione sono la gascromatografia e la cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC). Il fenomeno della ripartizione viene sfruttato per la separazione in colonna degli analiti, che a seconda delle caratteristiche chimico fisiche si legheranno più o meno stabilmente alla fase stazionaria e quindi avranno diverso tempo di ritenzione.

La cromatografia di ripartizione è chiamata in fase normale se la fase stazionaria è più polare della fase mobile, mentre è chiamata fase inversa (Reverse Phase) se la fase stazionaria è meno polare della fase mobile. Si tratta della tecnica più comunemente impiegata per la separazione di sostanze organiche.



GASCROMATOGRAFIA

La gascromatografia è impiegata per la separazione di sostanze volatili. Si presta meno facilmente a misure quantitative rispetto alla LC, in compenso ha maggiori potenzialità dal punto di vista diagnostico. Si possono separare sostanze appartenenti a varie classi:

- aromi (terpeni, esteri)
- idrocarburi a catena corta
- acidi carbossilici
- composti di interesse biochimico

Nella gascromatografia il campione è vaporizzato e poi iniettato in colonna; un gas costituisce la fase mobile ma in questo caso non ha alcuna interazione con i soluti in quanto agisce soltanto da carrier, cioè trasporta i soluti lungo la colonna.

I composti iniettabili in un sistema GC devono avere $T_{eb} < 300^{\circ}\text{C}$ e non devono essere termolabili, cioè non devono degradarsi per effetto della temperatura, pena l'impossibilità di riconoscerli nel campione.

GASCROMATOGRAFIA



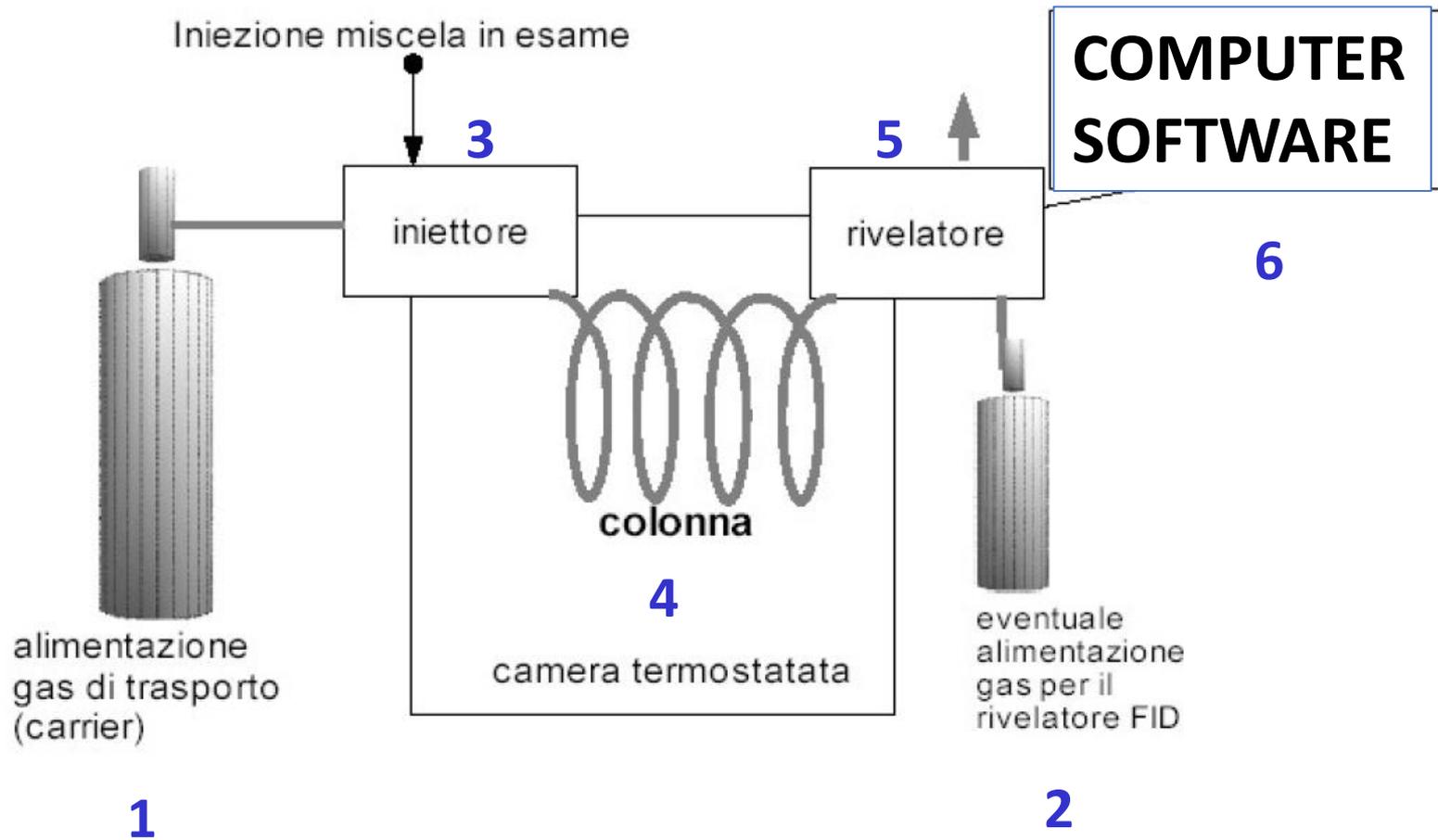
Gas-liquido

- supporto inerte solido
- liquido non volatile, legato covalentemente
- meccanismo di ripartizione
- moltissime applicazioni

Gas-solido

- fasi stazionarie di silice, allumina o carbone
- meccanismo di adsorbimento
- adatta per la separazione di gas permanenti (H_2 , He, Ar, O_2 , N_2 , CO) o idrocarburi a basso punto di ebollizione

GASCROMATOGRAFO



1) Sistema di alimentazione gas di trasporto (carrier)

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

2) Sistema di alimentazione dei gas per il rivelatore FID

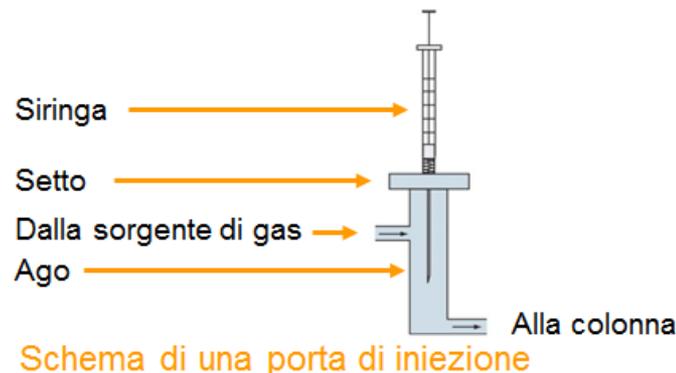
Qualora si utilizzi un rivelatore a ionizzazione di fiamma (FID) è necessario alimentare un combustibile ed un comburente (ad esempio idrogeno ed aria).

3) Iniettore o camera di iniezione

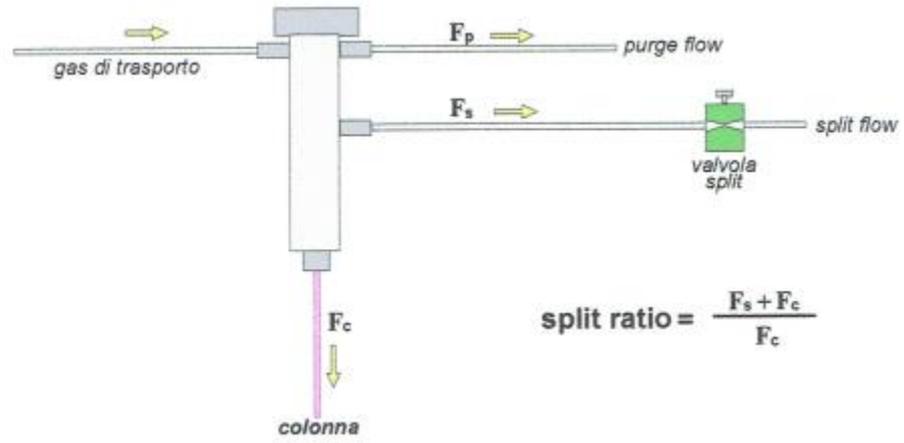
Assicura l'istantanea vaporizzazione del campione.

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

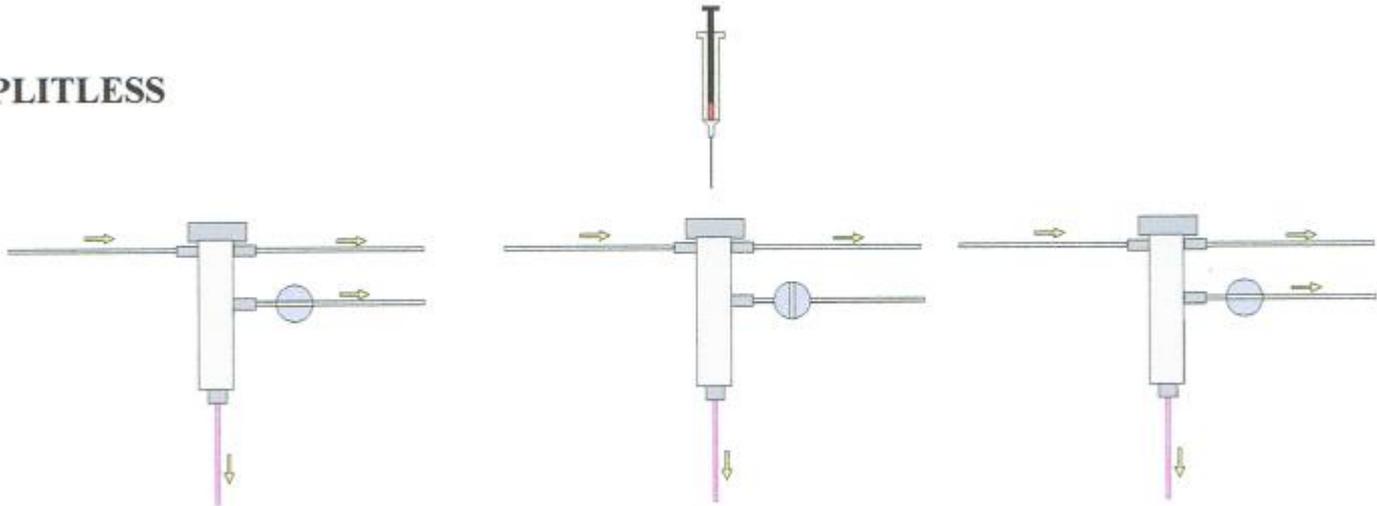
La camera di iniezione ha un sistema di resistenze variabili che permettono di mantenerla ad una determinata temperatura ritenuta più adatta per la vaporizzazione della miscela. Il campione viene introdotto con una micro siringa che deve forare un setto (disco di gomma resistente alle alte temperature), posto tra una ghiera metallica e il dispositivo di attacco alla colonna.



SPLIT



SPLITLESS



4) Colonna

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

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

Le colonne sono alloggiare in una **camera termostatica**, in genere a circolazione di aria calda, con questo sistema viene assicurata una buona stabilità di temperatura. La temperatura della camera termostatica (forno) può essere mantenuta costante per tutta la durata dell'analisi (isoterma) oppure fatta variare (programmata).

5) Rivelatore

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

Rivelatori più usati:

- **Rivelatore a ionizzazione di fiamma (*FID*) : *universale, ma distruttivo***
- **Rivelatore a cattura di elettroni (*ECD*): *selettivo e non distruttivo***
- **Rivelatore a termococonducibilità (*HWD*): *universale e non distruttivo***

Rivelatore a ionizzazione di fiamma (*FID*)

Rivelatore universale ma distruttivo in quanto i campioni vengono bruciati.

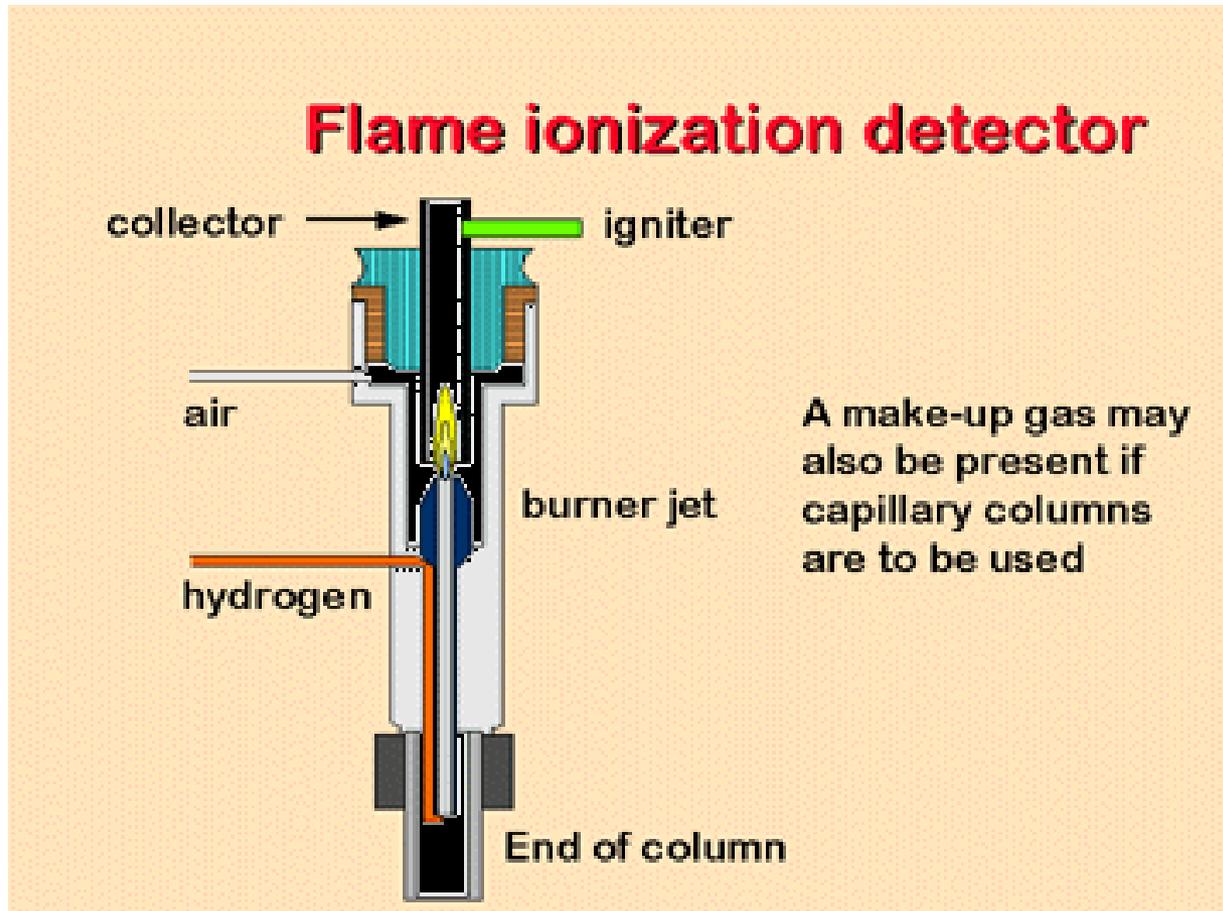
Il gas carrier viene convogliato ad un ugello a cui giungono idrogeno ed aria, necessari per alimentare una fiammella. Una resistenza posta accanto all'ugello provoca l'accensione della fiammella che è circondata da un collettore cilindrico caricato positivamente; il secondo elettrodo del circuito carico negativamente, è costituito dall'ugello stesso.

Le sostanze eluite contenute nel gas di trasporto vengono bruciate in una microfiamma di idrogeno ed aria che si estende fra i due elettrodi tra i quali è applicata una differenza di potenziale di 300 V. Per effetto della combustione si originano ioni e tra gli elettrodi si manifesta un passaggio di corrente elettrica di intensità proporzionale alla quantità delle sostanze bruciate.

Questa corrente, elaborata, amplificata e misurata, viene inviata ad un opportuno registratore. Quando non esce nessuna sostanza = rumore di fondo (linea di base). Quando un componente raggiunge la fiamma viene bruciato (ionizzato) e l'intensità di corrente aumenta e quindi rivelato con un segnale più intenso (picco).

Sostanze con potenziali di ionizzazione molto elevati non sono ionizzate in queste condizioni (acqua, solfuro di carbonio, anidride carbonica, ossido di carbonio, ossidi di azoto, ammoniacca, acido solfidrico, biossido di zolfo, acido formico, gas nobili, azoto e ossigeno). La sensibilità di questo rivelatore è molto elevata, ordine di nanogrammi.

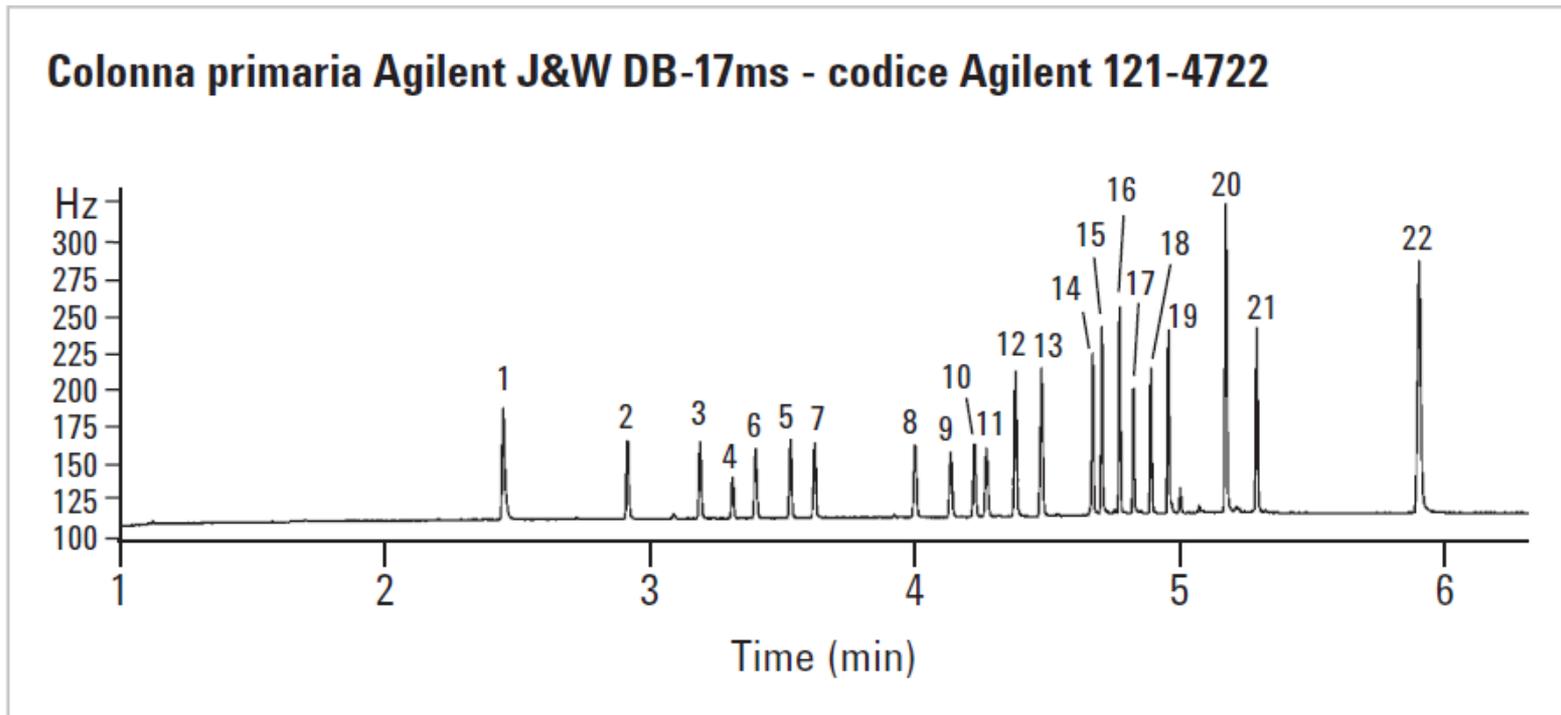
RIVELATORE FID



6) Computer (Registratore e integratore)

I moderni strumenti sono collegati ad un computer che permette la gestione sia dei parametri strumentali che dei dati ottenuti. Ad esempio, i software associati al gascromatografo consentono l'impostazione dei parametri strumentali (temperatura iniettore, forno e rivelatore), la registrazione del cromatogramma e l'elaborazione dei dati come, ad esempio, i valori dei tempi di ritenzione e il calcolo automatico delle aree dei picchi, quest'ultima operazione indispensabile per effettuare analisi di tipo quantitativo.

Analisi rapide dei pesticidi secondo i metodi CLP (Contract Laboratory Program): prestazioni delle colonne a confronto



*Il cromatogramma mostra che le **colonne primarie Agilent J&W DB-17ms** hanno risolto tutti i 22 picchi di interesse in meno di 6 minuti, con una simmetria netta e deriva minima dalla linea di base. Al contrario, la colonna primaria Restek ha risolto solo 20 dei 22 picchi, presentando diversi scodamenti. I risultati della colonna Restek sono riportati a pagina 11.*

Analisi del suolo: identificazione dei pesticidi organoclorurati

Pesticidi organoclorurati II - Metodo EPA 8081A (GC/MS)

Colonna: Agilent J&W DB-5ms, codice Agilent 122-5532, 30 m x 0,25 mm, 0,25 µm

Condizioni

Gas di trasporto: elio a 35 cm/sec, misurato a 50 °C

Forno: 50 °C per 1 min, 50-100 °C a 25 °C/min

100-300 °C a 5 °/min, 300 °C per 5 min

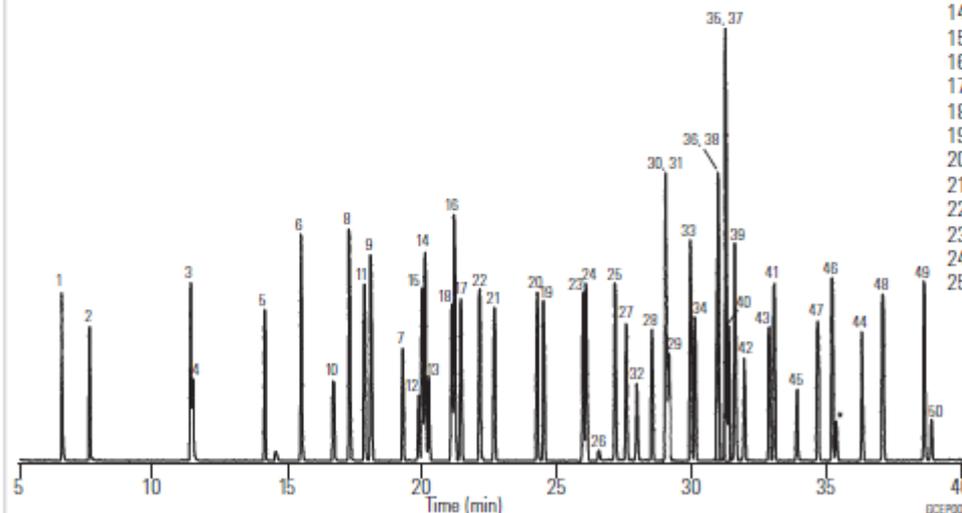
Iniezione: splitless, 250 °C, tempo di attivazione dello split 30 sec

Rivelatore: MSD, transfer line 300 °C, full scan con m/z 50-500

Campione: 1 µL di miscela standard EPA 8081A 35 µg/mL, AccuStandard Inc.

Identificazione dei picchi

- | | |
|---|-------------------------------|
| 1. 1,2-dibromo-3-cloropropano | 26. Kelthane |
| 2. 4-cloro-3-nitrobenzotrifluoruro (SS) | 27. Eptacloro epossido |
| 3. Esacloropentadiene | 28. g-clordano |
| 4. 1-bromo-2-nitrobenzene (IS) | 29. trans-nonacoloro |
| 5. Terrazole | 30. a-clordano |
| 6. Cloroneb | 31. Endosulfan I |
| 7. Trifluralin | 32. Captan |
| 8. 2-bromobifenile (SS) | 33. p,p'-DDE |
| 9. Tetracloro m-xilene (SS) | 34. Dieldrin |
| 10. a, a-dibromo-m-xilene | 35. Clorobenzilato |
| 11. Propaclor | 36. Pertane |
| 12. Diallato A | 37. Cloropropilato |
| 13. Diallato B | 38. Endrin |
| 14. Esaclorobenzene | 39. p,p'-DDD |
| 15. a-BHC | 40. Endosulfan II |
| 16. Pentacloronitrobenzene (IS) | 41. p,p'-DDT |
| 17. g-BHC | 42. Endrin aldeide |
| 18. b-BHC | 43. Endosulfan solfato |
| 19. Eptacloro | 44. Clorodato dibutilico (SS) |
| 20. Alaclor | 45. Captafol |
| 21. d-BHC | 46. Metossicloro |
| 22. Clorotalonil | 47. Endrin chetone |
| 23. Aldrin | 48. Mirex |
| 24. Dacthal | 49. cis-permetrina |
| 25. Isodrin | 50. trans-permetrina |
- * Prodotti di degradazione
 SS - Standard surrogato
 IS - Standard interno



Come standard sono state utilizzate miscele di soluzioni singole, gentilmente fornite da AccuStandard Inc., 25 Science Park, New Haven, CT 06511, 800-442-5290.

APPLICAZIONI ANALITICHE

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

Analisi qualitativa

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

I metodi utilizzabili per l'individuazione delle sostanze sono:

- dati di letteratura = tempi di ritenzione. MA questi valori dipendono da molti fattori: caratteristiche dello strumento, condizioni operative e operatore.
- Confronto dei tempi di ritenzione tra la miscela in esame e sostanze pure o miscele di composizione nota.
- Metodo basato sull'arricchimento. Quando si ritiene che un determinato picco corrisponda ad una sostanza nota, si aggiunge alla miscela una certa quantità di sostanza pura. Se compare un altro picco, siamo sicuri che la specie nota non è presente nella miscela, mentre se un picco risulta più alto, potrebbe essere presente e per questo è necessario effettuare altre analisi cambiando condizioni operative.
- Impiego di reattivi. Per evidenziare la presenza di determinati componenti si può far gorgogliare il gas in uscita entro una provetta contenente reattivi specifici. CON rivelatore non distruttivo.
- Impiego di strumenti ausiliari. Il gas in uscita da un rivelatore non distruttivo può essere fatto gorgogliare in appositi solventi e la soluzione indagata con altri metodi strumentali. **Collegare il gas-cromatografo ad uno spettrometro di massa**, in questo modo si può registrare lo spettro di massa il quale è univoco per una certa specie chimica (e fornisce poi importanti indicazioni strutturali).

Analisi quantitativa

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

Possibili complicazioni:

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

Esistono diverse metodologie per quantificare gli analiti separati tramite GC.

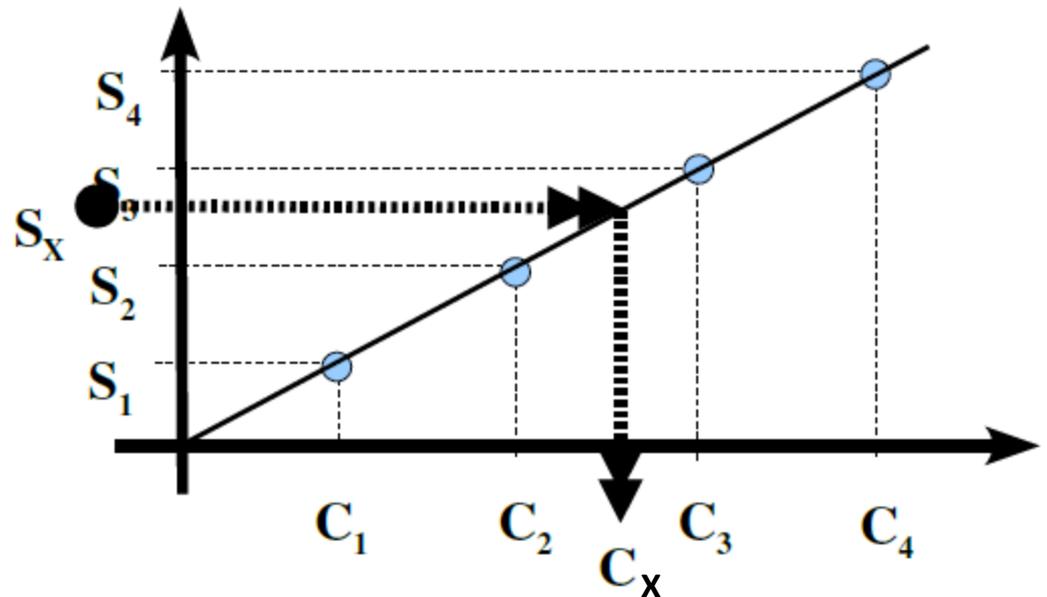
Le due più usate....

- **standardizzazione esterna:**

costruzione di una curva di taratura:

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

Problema: accuratezza dei volumi iniettati.



- **standardizzazione interna:**

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

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

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

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

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

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

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

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

Per una maggiore accuratezza, è possibile preparare più soluzioni note con diversi rapporti tra analita e standard interno ed ottenere così più valori di fattore di correzione che possono essere mediati.

Complicazione: preparazione di una miscela a concentrazione nota di standard interno e analiti. **Metodo più usato** quando non si analizzano gas.

COLONNE PER GASCROMATOLOGRAFIA

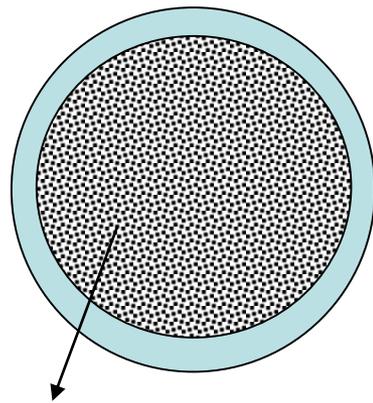


Colonne impaccate

Colonne capillari

Colonne impaccate

- contengono un supporto solido inerte, finemente suddiviso (comunemente basato su terra di diatomee), ricoperto di fase stazionaria liquida. La colonna è un tubo di acciaio o di vetro di lunghezza da 1 a 6 m e con diametro interno di 0.75 – 4 mm.



riempimento



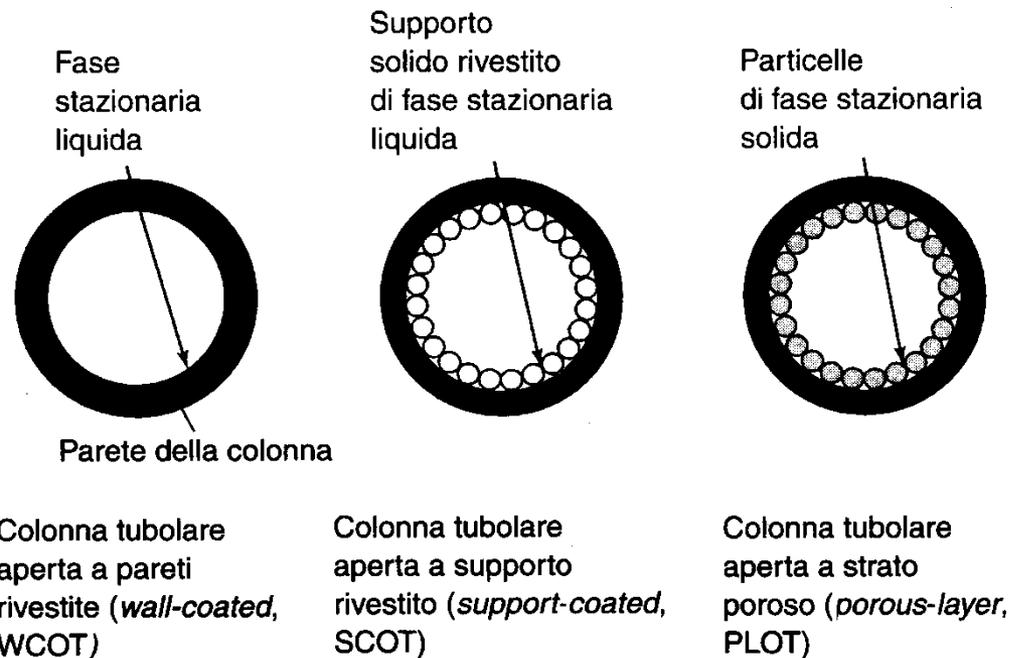
ID 0.75-4 mm



Colonne capillari

- WCOT (Wall Coated Open Tubular), strato sottile di fase liquida (1 μm) depositato sulla superficie delle pareti interne della colonna
- SCOT (Support Coated Open Tubular), strato poroso creato sulle pareti interne della colonna, per trattamento o deposizione chimica, su cui viene depositato uno strato sottile di fase liquida
- PLOT (Porous Layer Open Tubular), strato poroso polimerico o inorganico che funge da fase stazionaria per una cromatografia di adsorbimento

diametro 0.1-0.75 mm e lunghezza da 15 a 100 m. Il carrier percorre il canale lasciato libero dalla fase stazionaria



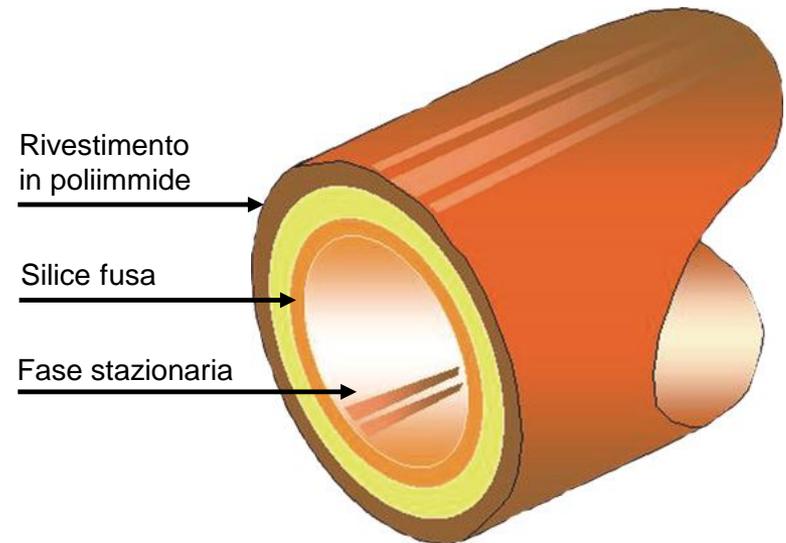
L'interno di una colonna capillare

Una colonna capillare per GC è composta da un tubo stretto (diametro interno compreso tra 0,05 e 0,53 mm) con un rivestimento polimerico sottile (0,1 – 10,0 μm) al suo interno.

La scelta della colonna capillare è un aspetto critico e dipende da fattori quali selettività, polarità e contenuto di gruppi fenile.

Il diametro della colonna incide su efficienza, ritenzione dei soluti, pressione in testa e velocità del gas di trasporto.

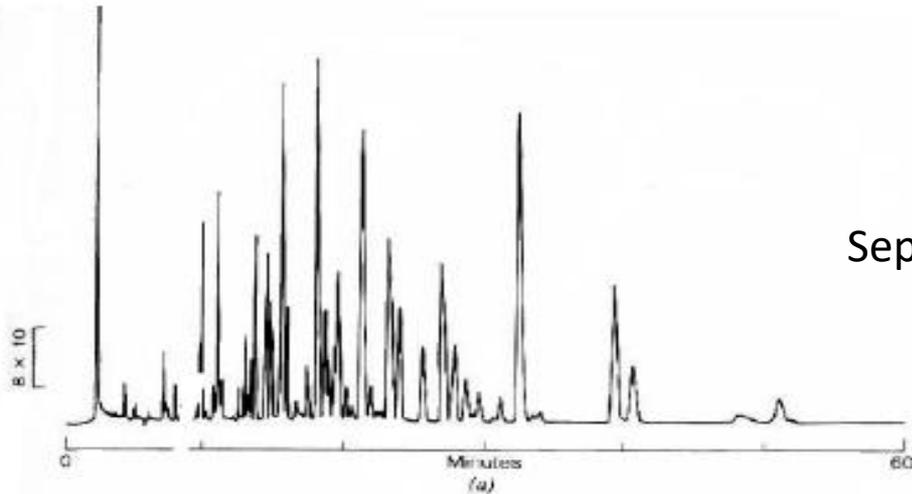
La lunghezza della colonna incide su ritenzione dei soluti, pressione in testa, livelli di spurgo e costi.



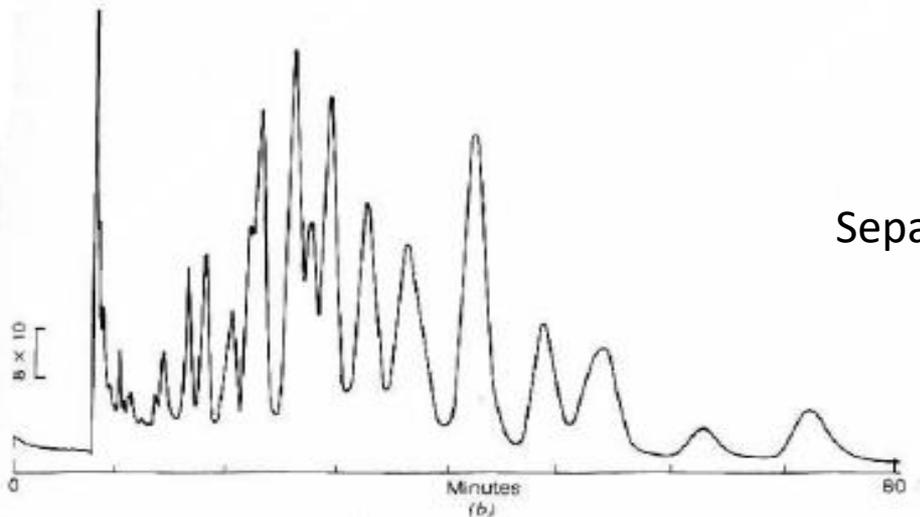
PER LE COLONNE CAPILLARI **N PUO' ESSERE UGUALE A **300000!!!****

CONFRONTO FRA COLONNE IMPACCATE E CAPILLARI

Le colonne capillari possono essere lunghe fino a 100 m e hanno quindi un numero di piatti teorici enormemente più elevato rispetto alle colonne impaccate



Separazione su colonna capillare



Separazione su colonna impaccata