

La cromatografia

La **cromatografia** (FIGURE da 1 a 3) è il metodo di separazione più complesso, ma nello stesso tempo il più moderno, che ha dato notevoli contributi all'evoluzione delle tecniche analitiche e anche industriali. Si realizza facendo scorrere un solvente (detto **fase mobile** o **eluente**) su un solido assorbente detto **fase stazionaria**.

Questa tecnica si basa principalmente sulla diversa ripartizione di una sostanza tra la fase mobile, che scorre all'interno del nostro sistema cromatografico e la fase stazionaria, che rimane immobile.

La fase stazionaria non deve reagire chimicamente con la fase mobile.

La ripartizione è un concetto analogo a quello dell'estrazione, infatti la sostanza da separare interagisce sia con la fase mobile che con quella stazionaria. Se la sostanza ha una maggiore affinità con la fase mobile scorrerà velocemente nel sistema cromatografico, se invece ha una maggiore affinità con la fase stazionaria scorrerà più lentamente.

Risulta chiaro che sostanze diverse presenti in un miscuglio avranno differenti ripartizioni con le due fasi (mobile e stazionaria), quindi scorreranno con tempi diversi nel sistema cromatografico, e si potranno così separare.

Le principali tecniche cromatografiche sono: su colonna, su strato sottile e su carta.

La differenza sostanziale tra le diverse tecniche è il supporto su cui vengono realizzate.

La **cromatografia su colonna** viene eseguita utilizzando delle colonne di vetro riempite con la fase stazionaria.

La miscela viene caricata dall'alto (FIGURA 1) e la si lascia assorbire nella fase stazionaria, poi si aggiunge il solvente (l'eluente), e si esegue l'eluizione.

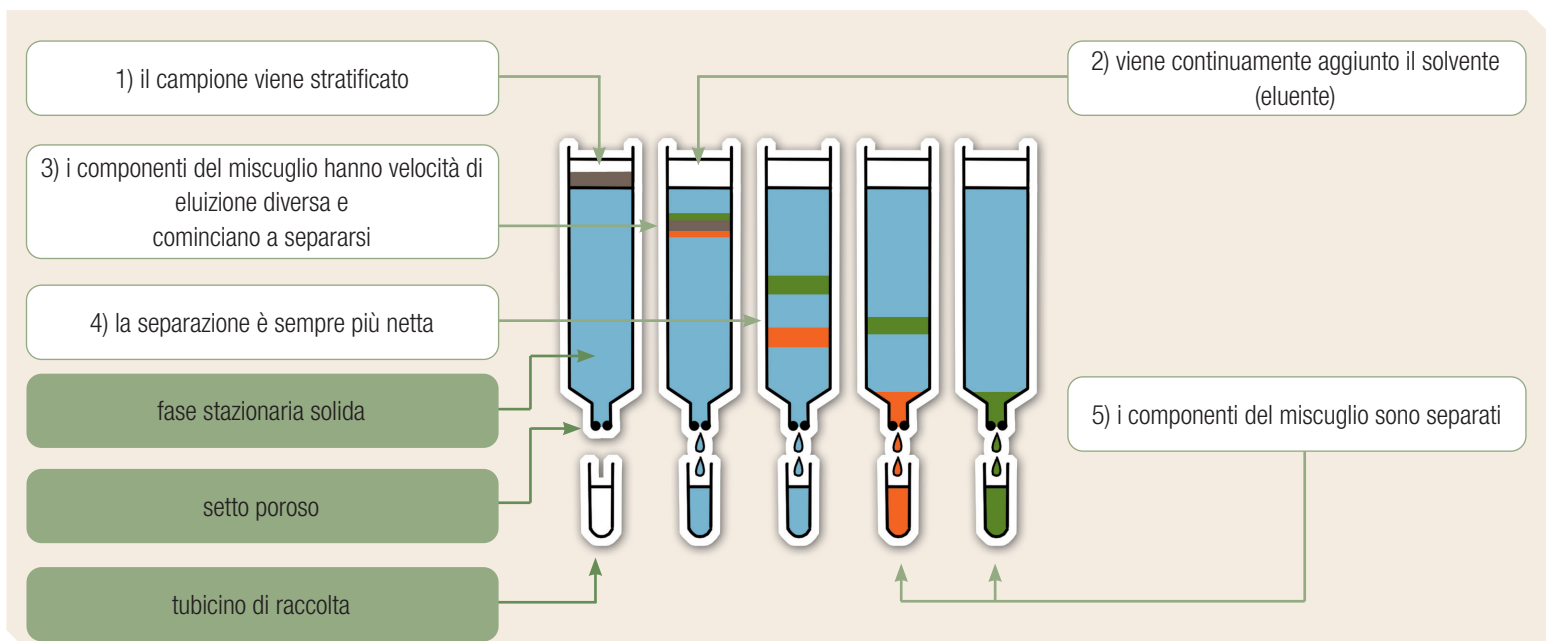


FIGURA 1 Schema della cromatografia su colonna

La **cromatografia su strato sottile** viene eseguita su una lastra di vetro o di alluminio dove è stratificata e cementata la fase stazionaria. Successivamente si deposita nella parte inferiore ad un centimetro dal margine una piccola quantità di miscela da separare, si introduce la lastra in una camera di sviluppo

(FIGURA 2), un contenitore di vetro dove al fondo si trova l'eluente (il solvente della cromatografia), che è chiusa ermeticamente.

Lo sviluppo della cromatografia è in senso ascendente (dal basso verso l'alto) poiché l'eluente sale per capillarità.

La **cromatografia su carta** (FIGURA 3) è analoga allo strato sottile solo che la fase stazionaria è composta da carta da filtro.

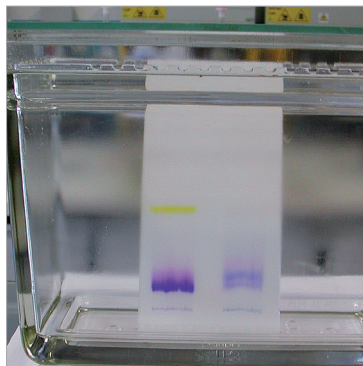


FIGURA 2 Cromatografia su strato sottile



FIGURA 3 Cromatografia su carta

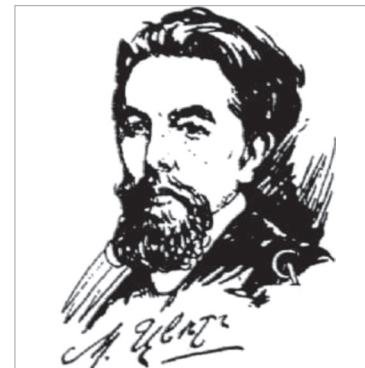


FIGURA 4 Mikhail Semenovich Tsvet, il padre della cromatografia

La cromatografia è il metodo di separazione che di più ha contribuito a sviluppare le tecniche analitiche di indagine chimica.

Ciò è dovuto alla sua elevata capacità di separare miscugli anche molto complessi.

Scoperta quasi per caso all'inizio del ventesimo Secolo, ha subito nel corso degli anni notevoli miglioramenti grazie anche all'utilizzo di materiali dalle prestazioni sempre più elevate e all'introduzione di sistemi elettronici e informatici moderni.

I sistemi cromatografici più evoluti impiegano le **colonne** come mezzi di supporto, quindi questo tipo di cromatografia viene detta su colonna.

I moderni apparecchi cromatografici utilizzano fasi mobili liquide e gassose.

La cromatografia in fase liquida si indica con l'acronimo **HPLC** (High Performance Liquid Chromatography) che tradotto significa cromatografia in fase liquida ad alte prestazioni.

Questa tecnica sfrutta l'elevata pressione del solvente (eluente) prodotta da una pompa meccanica.

Il solvente viene introdotto in una corta colonna di acciaio (circa 30 cm), dello spessore di circa 1 centimetro, riempita con una sostanza granulare chimicamente inerte (fase stazionaria).

Il miscuglio da separare viene introdotto in colonna con una siringa per mezzo di un iniettore.

Ne segue che la separazione è più efficiente, i tempi di separazione si riducono e le quantità di solvente utilizzato sono minime rispetto alla cromatografia a pressione atmosferica.

Nello strumento, all'uscita della colonna, è presente un rivelatore elettronico (detector) che in tempo reale identifica e quantifica le sostanze separate.

La moderna cromatografia in fase gassosa si indica con l'acronimo **HRGC** (High Resolution Gas Chromatography) che tradotto significa cromatografia in fase gassosa ad alta risoluzione.

Questa tecnica sfrutta il flusso di un gas (eluente) all'interno di un forno col quale si può variare la temperatura in molteplici modi.

Il gas viene introdotto in una lunghissima (anche 100 m) e sottilissima (meno di un millimetro) colonna di vetro cava, detta capillare, che nelle pareti porta stratificata una sostanza granulare chimicamente inerte (fase stazionaria).

Il miscuglio da separare deve avere un punto di ebollizione non molto elevato (< 160°C) e viene introdotto nella colonna con un apposito iniettore mediante apposita microsiringa (alcuni microlitri).

La separazione comincia a bassa temperatura e per mezzo di un programmatore si fa aumentare via via la temperatura del forno.

Dalla colonna usciranno prima le sostanze con un minore punto di ebollizione e successivamente quelle più altobollenti.

Nello strumento, all'uscita della colonna, è presente un rivelatore elettronico (detector) che in tempo reale identifica e quantifica le sostanze separate.

Con queste tecniche si possono identificare sostanze presenti anche in quantità bassissime che vanno dai milligrammi su litro (ppm) ai microgrammi su litro (ppb).

Il campo di analisi è vastissimo: la ricerca e lo sviluppo di prodotti industriali, le indagini di polizia scientifica, la scoperta di frodi sportive (doping), l'analisi degli inquinanti nei prodotti alimentari, nelle acque, nel suolo, nell'aria ecc.

La gascromatografia



FIGURA 5 Un moderno HRGC

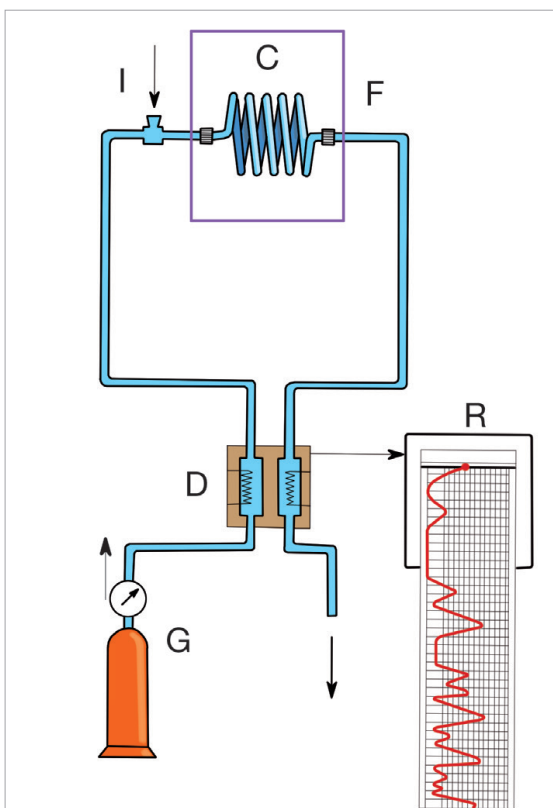


FIGURA 6 Schema di un gascromatografo (G = bombola del gas [carrier]; I = iniettore; C = colonna; F = forno; D = rivelatore o detector; R = integratore);

La **gascromatografia**, detta anche **cromatografia in fase gassosa**, è una moderna tecnica cromatografica che serve a separare e ad analizzare sostanze gassose o facilmente vaporizzabili. Viene impiegata con rapidità, efficienza e successo con sostanze organiche volatili come idrocarburi, solventi ecc. La gascromatografia è spesso impiegata nelle analisi di campioni provenienti da matrici alimentari. Essa impiega come fase mobile un gas e come elemento di separazione la temperatura della miscela carrier-sostanza volatile da analizzare. Lo strumento che realizza questa tecnica analitica è il gascromatografo (FIGURE 5 e 6).

Lo strumento è schematicamente semplice: esso è composto da una bombola che contiene il *carrier* gassoso che alimenta un sistema di iniezione del campione che a sua volta è collegato con una colonna posta all'interno di un forno. Il sistema di iniezione deve vaporizzare rapidamente la miscela liquida prima dell'iniezione in colonna. Nella colonna è presente una fase stazionaria che, interagendo con la miscela gassosa trasportata dal *carrier* inerte, produce la separazione dei singoli componenti della miscela gassosa. L'uscita della colonna è collegata ad un apparato di rivelazione (*detector*) che analizza qualitativamente e quantitativamente le diverse sostanze separate dall'apparato cromatografico.

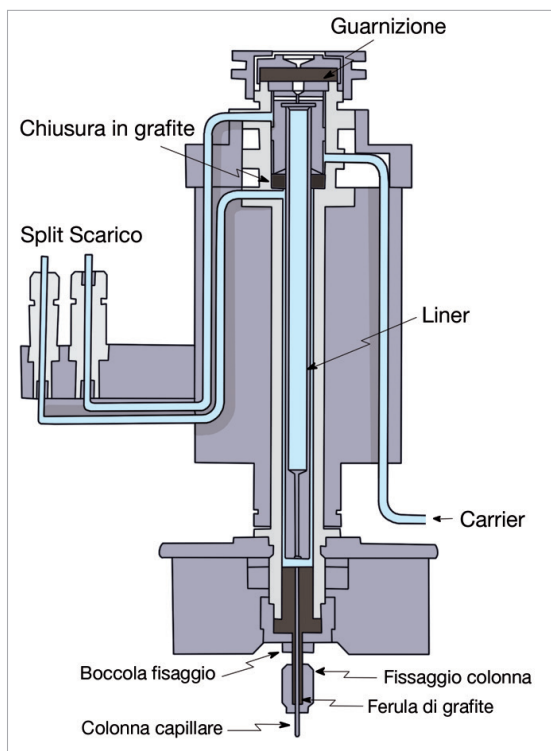


FIGURA 7 Schema di un iniettore

Anche se lo schema dello strumento è semplice le componenti elettroniche e i materiali impiegati nella realizzazione delle colonne e dello strumento stesso sono molto sofisticati ed avanzati. Le bombole contengono diversi tipi di gas che devono essere inerti e non devono interagire chimicamente con la fase stazionaria e con la miscela gassosa da separare. I gas più impiegati sono l'elio (**He**), l'azoto (**N₂**), l'argo (**Ar**) e l'idrogeno (**H₂**). Esistono diversi sistemi di iniezione, ma i più moderni sono gli iniettori split/splitless (FIGURA 7).

Gli iniettori hanno la funzione importantissima di introdurre il campione da



FIGURA 8 Una siringa per gascromatografia

analizzare all'interno della colonna di separazione. L'introduzione del campione deve essere rapida ed omogenea. All'interno dell'apparato di iniezione vi è un sistema di resistenze che termostatano l'iniettore alla temperatura desiderata. In questo modo l'operatore può programmare la temperatura di iniezione avendo la massima sicurezza sulla vaporizzazione del campione. Inoltre i moderni iniettori possono essere dotati di valvole di spurgo regolabili dall'analista che può operare in **modalità split** e **modalità splitless**. L'iniettore regolato in modalità **split** consente la fuoriuscita dallo strumento del solvente in cui è sciolto il campione da analizzare. Con la modalità **split** si può eliminare una buona parte del solvente in modo tale da concentrare il campione, ridurre i segnali di disturbo del *detector* e

impedire al solvente di coprire sostanze bassobollenti che fuoriescono quasi contemporaneamente al solvente. La modalità **split** può essere regolata dall'analista.

La modalità **splitless** prevede la chiusura della valvola di spurgo e l'iniettore si comporta come un iniettore di tipo *on column* ed inietta tutta la miscela in colonna. Nella parte superiore dell'iniettore vi è una guarnizione di gomma che funge da membrana tra l'esterno e la colonna.

Il campione viene prelevato con una speciale siringa (FIGURA 8) della portata di 10 microlitri (μl) con una sensibilità di 0,1 microlitri (μl). Ricordiamo che la **portata** di uno strumento è la misura massima che può effettuare, mentre la sensibilità la misura più piccola. Il campione viene iniettato in colonna facendo penetrare l'ago della siringa attraverso la guarnizione nel **liner** dell'iniettore e spingendo rapidamente il pistoncino della siringa.

La colonna cromatografica è contenuta in un forno ventilato (FIGURA 9) con un sistema di coibentazione e termostatazione molto efficiente ed avanzato. Il forno deve avere una grande capacità di termostatazione, cioè deve mantenere costante la temperatura programmata e deve essere rapido nel far aumentare o diminuire la temperatura al suo interno.

L'analisi gascromatografica deve essere programmata: allo scopo vi è nel gascromatografo il **programmatore**. Questo apparecchio elettronico permette all'analista di impostare la temperatura di partenza di iniettore e forno, di far aumentare la temperatura (rampa) a una certa velocità espressa in gradi centigradi al minuto ($^{\circ}\text{C}/\text{min}$), oppure di lavorare a temperatura costante (**isoterma**).

Nella FIGURA 10 è mostrata una tipica programmazione di un'analisi gascromatografica.

Si evince dalla figura che l'analista ha iniziato l'analisi con una isoterma programmata (solitamente 50°C), ha mantenuto la prima isoterma per alcuni minuti; successivamente ha programmato la prima rampa con un gradiente di $X^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Il terzo stadio dell'analisi prevede una isoterma per un certo tempo ad una certa temperatura all'incirca intermedia tra l'iniziale e la finale. Il quarto stadio dell'analisi prevede una seconda rampa con un gradiente di $Y^{\circ}\text{C}/\text{min}$ (dal grafico possiamo vedere che il gradiente Y è maggiore del gradiente X).

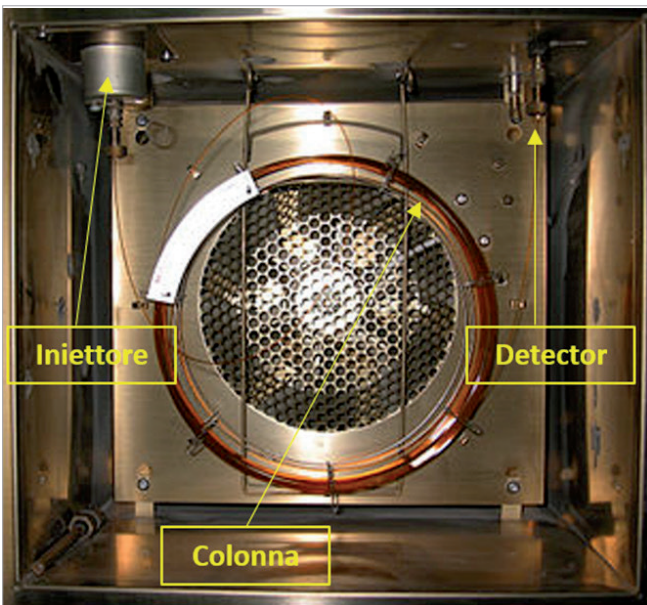


FIGURA 9 Il forno di un gascromatografo. Da notare che la colonna capillare è collegata in ingresso all'iniettore e in uscita al *detector*

Il terzo stadio dell'analisi prevede una isoterma per un certo tempo ad una certa temperatura all'incirca intermedia tra l'iniziale e la finale. Il quarto stadio dell'analisi prevede una seconda rampa con un gradiente di $Y^{\circ}\text{C}/\text{min}$ (dal grafico possiamo vedere che il gradiente Y è maggiore del gradiente X).

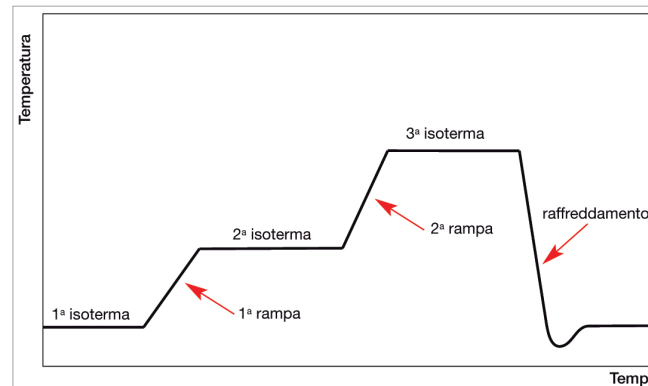


FIGURA 10 Schema di un'analisi gascromatografica con temperatura programmata; nei tratti isotermici la temperatura viene mantenuta costante, mentre nelle rampe la temperatura varia

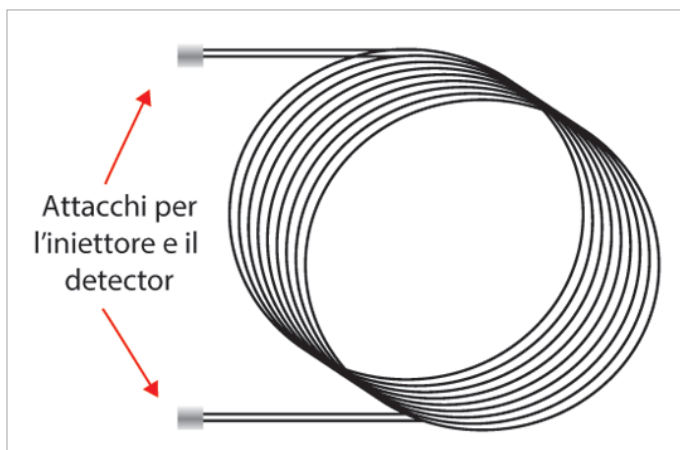


FIGURA 11 Una colonna impaccata

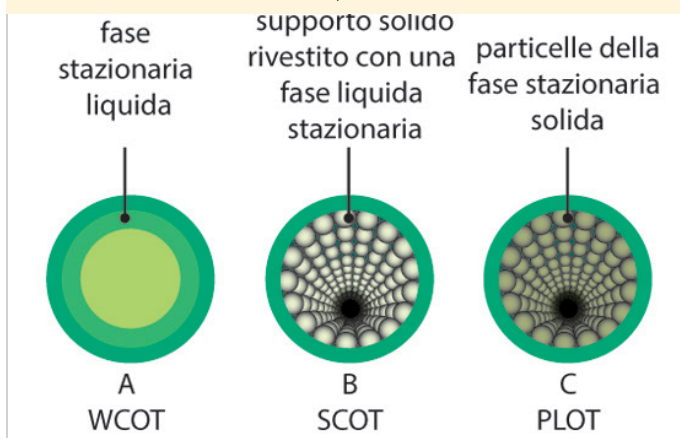


FIGURA 12 Le colonne capillari

Infine l'analisi si conclude con una isoterma ad una temperatura maggiore. L'analisi termina quando è fuoriuscita l'ultima sostanza e lo strumento si raffredda automaticamente per essere pronto per un'altra analisi.

Una componente molto importante dello strumento è la **colonna** di separazione. Esistono sostanzialmente due tipi di colonne, le impaccate e le capillari.

Le colonne impaccate (FIGURA 11) sono le prime colonne impiegate in gascromatografia. Sono composte da un tubo d'acciaio (ma esistono anche in vetro) della lunghezza di un metro e dal diametro di qualche millimetro. Le colonne impaccate possono essere preparate riempiendo la struttura tubolare con la fase stazionaria liquida mescolata con un supporto solido inerte veicolata da un solvente.

Le colonne capillari (FIGURA 12) sono costituite da un tubicino in silice fusa resistente alla temperatura della lunghezza variabile (si va dai 10 metri ai 100 metri a seconda del tipo di analisi che si deve effettuare). Il diametro delle colonne capillari varia dai 0,2 mm ai 0,8 mm. Le colonne capillari possono essere:

- **colonne capillari aperte** (WCOT = Wall Coated Open Tubular), nelle quali le pareti della colonna sono ricoperte dalla fase stazionaria liquida (FIGURA 12A);
- **colonne capillari aperte con rivestimento supportato** (SCOT = Support Coated Open Tubular), nelle quali su un supporto granulare poroso aderente alle pareti della colonna è depositato un sottilissimo film di liquido di ripartizione (FIGURA 12B);
- **colonne capillari aperte con rivestimento poroso** (PLOT = Porous Layer Open Tubular), nelle quali la fase stazionaria è costituita solo da particelle porose aderenti alle pareti della colonna (FIGURA 12C).

Le colonne capillari hanno soppiantato di fatto le impaccate poiché, essendo molto lunghe, hanno prestazioni in termini di risoluzione molto maggiori. Si parla in questo caso di **gascromatografia ad alta risoluzione** (HRGC = High Resolution Gas Chromatography). Altro elemento fondamentale per l'analisi gascromatografica ed il relativo strumento è il rivelatore o *detector*. Questa apparecchiatura è molto sofisticata ed è interfacciata con un apparato elettronico ed un elaboratore di dati. L'apparato di rivelazione e di codifica del segnale è molto sofisticato poiché deve fornire all'analista risultati accurati e rapidi.

TABELLA 1 Fasi stazionarie impiegate in gascromatografia

Fase stazionaria	Composizione	Grado di polarità	Temperatura massima sopportata	Utilizzo
TCEP	Nitrili	Fortemente polare	200	Composti aromatici, steroidi, pesticidi
Carbowax 400	Poliglicoli	Polare	100°C	Ammine, alcol
DEGS	Poliesteri	Polare	200°C	Generale, esteri metilici degli acidi grassi
LAC 1R	Poliesteri	Polare	200°C	Generale, esteri metilici degli acidi grassi
Tricresil solfato	Esteri	Mediamente polare	120°C	Oli essenziali, alcol
Versamid 940	Poliammidi	Mediamente polare	250°C	Generale, composti organici azoitati
Dinonilftalato	Esteri	Debolmente polare	150°C	Generale, composti organici ossigenati
OV 17	Siliconi	Debolmente polari	300°C	Generale, steroli
Squalano	Idrocarburi a lunga catena	Apolari	160°C	Generale, idrocarburi
Apiezon	Idrocarburi a lunga catena	Apolari	280°C	Generale, idrocarburi

I rivelatori più usati sono i cosiddetti **FID** (FIGURA 13), dall'acronimo inglese Flame Ionization Detector (rivelatore a ionizzazione di fiamma). I gascromatografi dotati di rivelatore **FID** devono avere due bombole del gas, una per il *carrier* (l'eluente gassoso) e una l'idrogeno (H_2) che serve ad alimentare la fiamma del detector. Il **FID** pertanto è un rivelatore distruttivo poiché brucia la sostanza da analizzare.

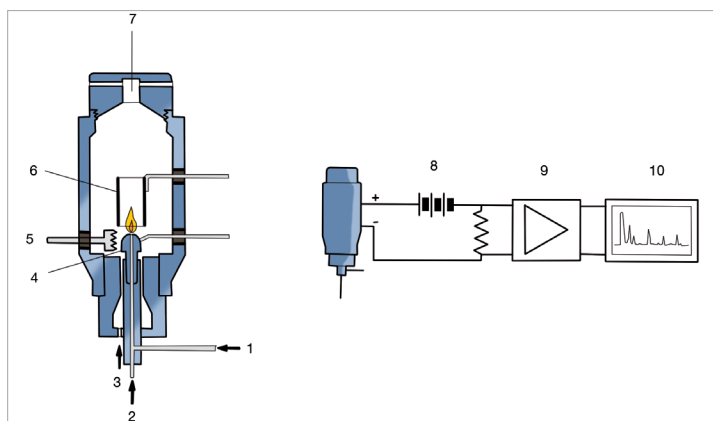


FIGURA 13 Schema di un FID (flame ionization detector)

Nella FIGURA 13 vediamo lo schema costruttivo di un **FID**: la sostanza da analizzare separata dalla colonna cromatografica arriva al rivelatore trasportata dal *carrier* (di solito si impiega azoto). Una volta uscita dalla colonna (punto 2 della FIGURA 13) la miscela gassosa (*carrier* e analita) viene mescolata all'idrogeno combustibile (punto 1) e all'aria comburente (punto 3). La resistenza (punto 5) ha innescato la combustione della miscela gassosa. L'ugello del bruciatore (punto 4) e il collettore (punto 6) formano una coppia di elettrodi sui cui capi è applicata una differenza di potenziale costante di 300 volt. Se la fiamma è alimentata con il solo idrogeno e l'aria vi è un passaggio minimo di corrente nel circuito elettrico e questo rappresenta il cosiddetto **rumore di fondo** del detector. Se invece nel bruciatore arriva una sostanza organica essa viene combusta e il detector segnala un aumento del segnale elettrico. Tale segnale

è direttamente proporzionale alla quantità di sostanza che arriva al bruciatore. Il segnale elettrico viene poi trasformato graficamente in un picco. Vi sono diversi tipi di detector, alcuni distruttivi come il **FID** e altri non distruttivi. I rivelatori o detector distruttivi (**FID**, **FPD** ecc.) distruggono le sostanze separate dalla colonna cromatografica; i detector non distruttivi no (**TCD**, **ECD** ecc.). Citiamo alcuni dei detector maggiormente impiegati nelle analisi gascromatografiche:

- **TCD (Termal Conductivity Detector)**, rivelatore termococonduttivo, composto da due filamenti di una lega speciale a base di nichel e tungsteno o platino posti in due setti identici separati, in uno passa il *carrier* puro (gas di confronto) e nell'altro passa il *carrier* con la sostanza da rilevare; il detector rileva la differenza di conducibilità elettrica dovuta alla variazione di temperatura che si realizza tra l'analita e il gas di confronto. Il segnale elettrico viene poi trasformato graficamente in un picco;
- **ECD (Electron Capture Detector)**, rivelatore a cattura di elettroni, è caratterizzato da una piastra radioattiva (l'isotopo ^{63}Ni) che emette raggi β (elettroni veloci) che colpendo il *carrier* (azoto) producono ioni azoto positivi che vengono rilevati da un elettrometro; questo produce una corrente di fondo. Quando invece assieme al *carrier* è presente una sostanza contenente atomi molto elettronegativi come il cloro o gli altri alogeni, gli elettroni vengono catturati da questi ultimi facendo variare il segnale elettrico. Il segnale elettrico viene poi trasformato graficamente in un picco;
- **MS (Mass Spectrometer)**, spettrometro di massa. Definiremo meglio nel seguito del Percorso questo particolare e formidabile rivelatore.

TABELLA 2 Alcune caratteristiche dei detector più impiegati			
Rivelatore	Limite di rivelabilità	Gas impiegati	Note
FID	0,1-10 ppm	O ₂ , aria (detector) He, N ₂ (carrier)	Universale (tranne l'acqua), distruttivo, economico.
TCD	5-20 ppm	Carrier e gas di confronto devono essere uguali	Universale (tranne per il carrier) non distruttivo, economico.
ECD	0,1-10 ppb (alogenuri) 1-100 ppb (nitrocomposti) 0,1-10 ppb (carbonili)	Ar, N ₂ (carrier)	Selettivo per alogenuri organici, nitrocomposti organici e carbonili. Non economico.
MS	1-10 ppb	-	Universale, costoso

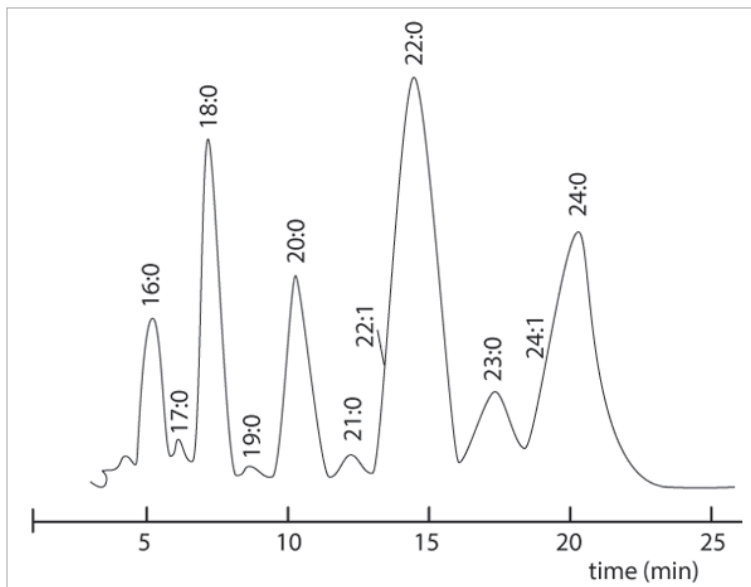


FIGURA 14 Tipico grafico prodotto da un gascromatografo dotato di colonna impaccata

Dalla **TABELLA 2** si evincono le principali caratteristiche di alcuni rivelatori impiegati nelle analisi gascromatografiche. Si può notare che i limiti di rivelabilità sono molto bassi: essi vanno dai **ppm** (parti per milione → milligrammi su litro di soluzione) fino ai **ppb** (parti per miliardo → microgrammi su litro di soluzione). Ricordiamo che il **limite di rivelabilità** dello strumento è la minima quantità di analita che produce nel rivelatore un segnale elettrico di intensità doppia rispetto al rumore di fondo. Il sistema elettronico di traduzione del segnale elettrico lo trasforma, attraverso un'interfaccia informatica (un computer), in un grafico. In tale grafico le diverse sostanze sono rappresentate da diversi picchi. Nella coordinata orizzontale (**ascissa**) del grafico viene riportato il tempo detto di ritenzione, mentre nella coordinata verticale (**ordinata**) l'altezza del picco (**FIGURE 14 e 15**). Il **tempo di ritenzione** è il tempo necessario a una data sostanza X ad attraversare tutto il sistema cromatografico. Tale generica sostanza X viene iniettata in colonna assieme alla miscela dall'iniettore, viene separata dalle altre sostanze della miscela dalla colonna e rivelata infine al detector.

Nelle **FIGURE 14 e 15** sono mostrati due grafici prodotti rispettivamente da un gascromatografo a colonna impaccata e da un gascromatografo a colonna capillare. Si nota subito che i picchi del gascromatogramma della **FIGURA 15** ha i picchi più stretti e meglio separati gli uni dagli altri rispetto al grafico della **FIGURA 14**.

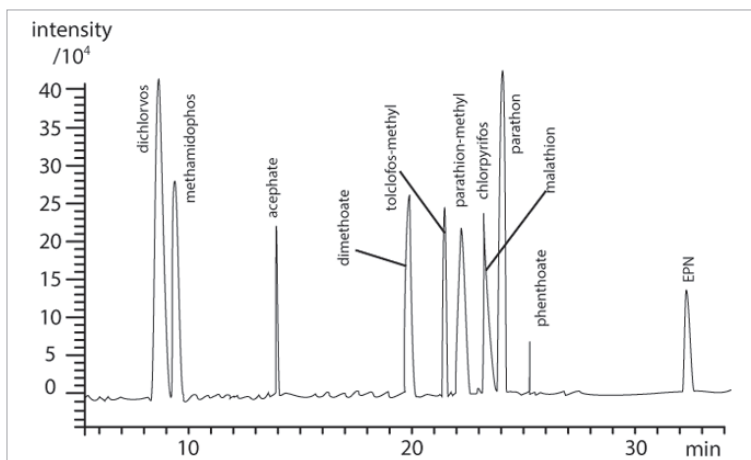


FIGURA 15 Tipico grafico prodotto da un gascromatografo dotato di colonna capillare (HRGC)

Questo è dovuto al fatto che la colonna capillare, essendo molto più lunga e tecnologicamente più sofisticata dell'impaccata, produce delle separazioni più efficienti e i picchi sono meglio risolti, cioè più distanziati gli uni dagli altri.

L'uso del gascromatografo implica l'adozione della metodica analitica specifica per l'analisi che si deve effettuare. In dette metodiche è previsto:

- l'uso della colonna più appropriata al tipo di analisi da effettuare;
- l'impostazione delle condizioni operative dello strumento (flusso del *carrier*, programmazione delle rampe e delle isoterme ecc.);
- l'impiego del detector appropriato al tipo di analisi da effettuare;
- l'impiego delle tecniche appropriate di analisi qualitativa e quantitativa.

Metodi di analisi gascromatografici

L'analisi gascromatografica è un'analisi di tipo qualitativo e quantitativo. Prima di spiegare le tecniche di analisi soffermiamoci su alcune definizioni. Il **tempo di ritenzione** (t_R) di una generica sostanza **X** è il tempo che impiega la sostanza stessa ad attraversare il sistema cromatografico. Quando la miscela viene iniettata nella colonna il sistema di elaborazione dei dati fa partire un timer che registra, attraverso il segnale del detector, il tempo d'uscita di ogni sostanza separata dalla colonna cromatografica. Il sistema di elaborazione dei dati fornisce anche un altro dato che è rappresentativo dell'area del picco. L'area del picco è proporzionale alla quantità di sostanza rilevata dal detector e, come vedremo in seguito, questo è un dato molto importante.

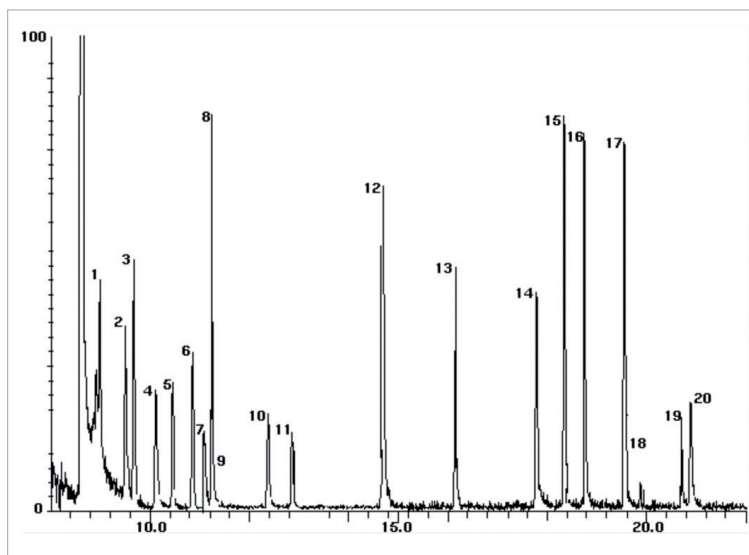


FIGURA 16 Gascromatogramma dell'esempio del metodo dello standard interno

Il metodo analitico che studieremo è il metodo dello **standard interno**. Questo metodo è basato sulla conoscenza approfondita del tipo di miscela che si deve ricercare, per esempio pesticidi organofosforici, pesticidi alogenati, alcoli e steroli di un olio di oliva.

Una volta che l'analista conosce bene la matrice di provenienza del campione d'analisi prepara una soluzione in un opportuno solvente, purissimo per gascromatografia (etere di petrolio, esano, acetato di etile ecc.), a concentrazione unitaria, per esempio 1 mg/l dei componenti della miscela di sostanze che si vuole analizzare. In commercio è presente una vasta gamma di sostanze. Tale miscela è detta «miscela di standard» e contiene una sostanza che non si trova nelle matrici da analizzare. Questa sostanza estranea viene detta **standard interno**. Una volta preparata la miscela di standard a concentrazione unitaria si accende il gascromatografo e si imposta la programmazione delle isoterme e delle rampe (vedi paragrafo 2). Quando il cromatografo è pronto per l'analisi si inietta la miscela di standard e si attende che l'analisi si completi. Lo strumento è

completamente automatizzato e una volta dato lo start non si interviene.

Nella **TABELLA 3** sono mostrati i tempi di ritenzione delle diverse sostanze della miscela di standard elaborate dal sistema di elaborazione dei dati del cromatografo e l'area dei relativi picchi delle diverse sostanze eluite nel campione dell'esempio del metodo dello standard interno.

TABELLA 3 Tempi di ritenzione (t_R) e area dei relativi picchi delle diverse sostanze eluite nel campione dell'esempio del metodo dello standard interno

Picco nr	t_R	Area picco	Picco nr	t_R	Area picco
1	4,81	7541	11	12,88	9428
2	7,72	6240	12	14,52	7327
3	8,01	8315	13	16,23	6928
4	10,22	3754	14	17,85	11628
5	10,42	3841	15	18,41	10728
6	10,65	4685	16	18,94	10428
7	11,21	2548	17	19,65	1148
8	11,44	11492	18	19,81	2831
9	11,63	3048	19	20,84	3081
10	12,48	2892	20	21,01	3482

Per effettuare l'**analisi qualitativa** si calcolano i tempi di ritenzione relativi (t_{RRx}) con la seguente formula matematica:

$$t_{RRx} = t_{RX} / t_{Rsd}$$

dove t_{RX} è il tempo di ritenzione assoluta delle diverse sostanze della miscela (t_{R1} , t_{R2} ecc.) e t_{Rsd} è il tempo di ritenzione assoluta dello **standard interno**, che nell'esempio è la sostanza numero 12. Il tempo di ritenzione relativo è molto importante per l'analisi qualitativa perché, nelle stesse condizioni di analisi, esso rimarrà pressoché costante. Quindi attraverso il tempo di ritenzione relativo possiamo identificare le diverse sostanze (analisi qualitativa). I tempi di ritenzione relativi (t_{RRx}) sono mostrati nella **TABELLA 4**.

TABELLA 4 Tempi di ritenzione relativi (t_{RR}) e i fattori di correzione delle diverse sostanze eluite nel campione dell'esempio del metodo dello standard interno

Picco nr	t_{RR}	F_C	Picco nr	t_{RR}	F_C
1	0,331267	0,9716218	11	0,887052	0,7771532
2	0,53168	1,1741987	12	1	1
3	0,551653	0,8811786	13	1,117769	1,0575924
4	0,703857	1,9517848	14	1,229339	0,630117
5	0,717631	1,9075762	15	1,267906	0,6829791
6	0,733471	1,5639274	16	1,304408	0,7026275
7	0,772039	2,8755887	17	1,353306	6,3824042
8	0,787879	0,637574	18	1,364325	2,5881314
9	0,800964	2,4038714	19	1,435262	2,378124
10	0,859504	2,5335408	20	1,44697	2,1042504

Osservando la **FIGURA 16** si nota che i picchi del grafico non sono tutti uguali anche se i componenti della soluzione hanno tutti la stessa concentrazione che abbiamo ipotizzato di 1 ppm (1 mg/l) (ppm = parti per milione). Ciò è dovuto al fatto che il detector può rispondere in maniera diversa a seconda della sostanza che sta analizzando. Per ovviare a questo inconveniente si calcolano i fattori di correzione (F_C) per ogni sostanza (**TABELLA 4**). I fattori di correzione si calcolano con la seguente formula matematica:

$$F_C = A_{sd} / A_x$$

dove A_{sd} è l'area del picco dello standard e A_x è l'area del picco delle diverse sostanze della miscela (A_1 , A_2 ecc.). Una volta determinati i tempi di ritenzione relativi (t_{RRx}) e i fattori di correzione (F_C) della miscela di standard si procede con l'analisi vera e propria dei campioni incogniti. La sostanza che abbiamo usato come standard (il picco numero 12) nella prima fase deve essere una sostanza estranea alle miscele che andiamo ad analizzare. Con delle pipette automatiche si producono delle soluzioni di campione incognito con la sostanza standard a concentrazione unitaria. Si ripete la stessa procedura analitica strumentale vista in precedenza, nelle stesse condizioni sperimentali. Dai tempi di ritenzione relativi si riesce ad individuare qualitativamente le diverse sostanze. Elaborando l'area dei picchi rilevati nell'analisi del campione incognito si ottengono le concentrazioni delle singole sostanze (C_x) componenti la miscela. Per ottenere ciò si applica la seguente formula:

$$C_x = A_x \cdot C_{SD} \cdot F_C$$

Dove A_x è l'area del picco registrato, C_{SD} è la concentrazione dello standard (**1 ppm**) e F_C il fattore di correzione.

TABELLA 5 Unità di concentrazione impiegate in gascromatografia e loro spiegazione

Unità di concentrazione	Spiegazione dell'unità di concentrazione
1 ppm = 1 mg/l	1 mg (milligrammo = $1 \cdot 10^{-3}$ g = $1 \cdot 10^{-6}$ kg) di soluto in 1 litro di soluzione
1 ppb = 1 µg/l	1 µg (microgrammo $1 \cdot 10^{-6}$ g = $1 \cdot 10^{-9}$ kg) di soluto in 1 litro di soluzione

HPLC (High Performance Liquid Chromatography) cromatografia liquida ad alta prestazione



FIGURA 17 Un moderno HPLC

La cromatografia liquida ad alta prestazione (**HPLC** → High Performance Liquid Chromatography) è l'evoluzione strumentale della cromatografia su colonna che abbiamo già trattato nel paragrafo 1.

L'apparato strumentale migliora in maniera esponenziale le prestazioni della colonna che opera per caduta a pressione atmosferica. Lo strumento impiega delle colonne con una lunghezza che va da 10 a 30 centimetri e un diametro interno dai 2 ai 5 millimetri. L'aspetto più interessante dello strumento risiede nel fatto che impiega delle particelle di fase stazionaria con diametri piccolissimi, dai 3 ai 10 micron ($1 \mu\text{m} = 1 \cdot 10^{-6} \text{m}$). Per poter effettuare delle separazioni con fasi stazionarie così finemente suddivise ed impaccate occorre impiegare dei solventi ad elevatissima pressione. Gli HPLC impiegano delle pompe che operano con pressioni dell'ordine delle cento atmosfere. Il risultato finale è una grande efficienza di separazione delle sostanze in tempi molto brevi. Le diverse fasi stazionarie impaccate nelle colonne basano il loro effetto separatore sui principi di adsorbimento, ripartizione, scambio ionico ed esclusione (vedi estensione online **La cromatografia**).

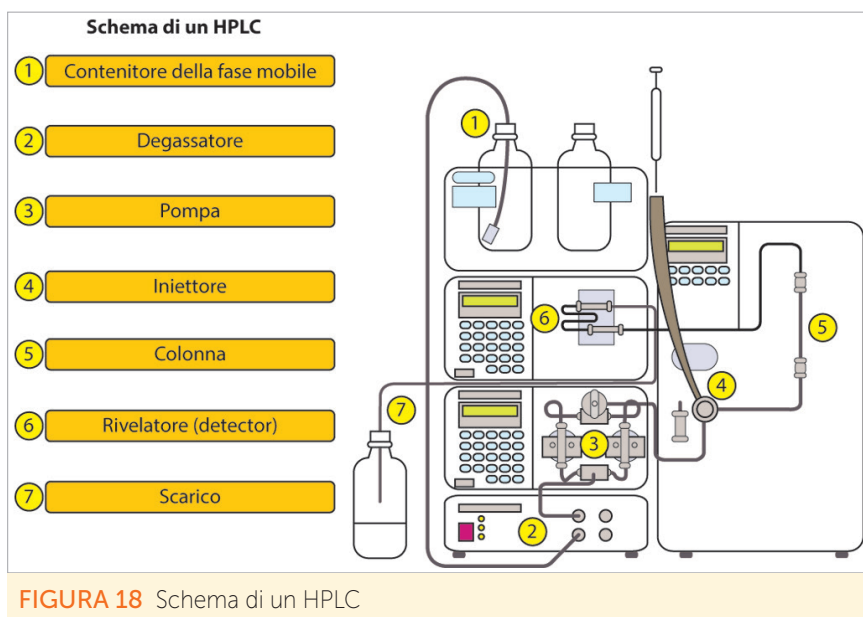


FIGURA 18 Schema di un HPLC

Nella FIGURA 18 è schematizzato un tipico apparecchio per HPLC. Esso è composto da uno o più contenitori delle fasi mobili (1), da un apparato degassatore (2), da una pompa ad alta pressione (3), da un sistema d'iniezione (4), dalla colonna rinchiusa in un apparato a termostatazione controllata (5), dall'apparato rivelatore (6) e dallo scarico (7). La separazione può essere condotta, attraverso un dispositivo **programmatore**, impiegando un singolo eluente (**eluizioni isocratiche**), o una miscela di eluenti (**eluizioni a gradiente**). Tutte le modalità del tipo di eluente da impiegare nell'analisi vengono scelte dall'analista che programma lo strumento. Lo strumento poi, in automatico, esegue tutte le istruzioni programmate. Il singolo solvente o la miscela di più solventi, una volta prelevati automaticamente dai loro contenitori, vengono degassati. Se infatti vi sono dei gas disciolti vengono eliminati attraverso l'impiego di ultrasuoni.

La presenza di bollicine di gas nei solventi limita la riproducibilità delle analisi in quanto interferisce con l'efficienza della colonna. Una volta degassati i solventi, questi vengono aspirati da una pompa che li comprime fino alla pressione intorno alle cento atmosfere. Esistono diversi tipi di pompe, tutte devono avere come caratteristica principale il poter mantenere costante la pressione e il flusso del solvente in maniera tale che l'analisi sia precisa ed accurata. Una volta che il solvente ha raggiunto la pressione ottimale attraversa la colonna e la condiziona, cioè la stabilizza e la rende pronta per l'analisi. Gli standard o i campioni dell'analisi, come già visto per la gascromatografia, vengono iniettati in colonna, con delle siringhe, per mezzo degli iniettori. Le colonne moderne impiegate in HPLC sono costituite da un supporto inerte in silice che è chimicamente legata alla fase stazionaria (TABELLA 6).

TABELLA 6 Fasi stazionarie impiegate in HPLC (la più impiegata è la C18)

Fasi stazionarie	Struttura molecolare
Ammino	$-(\text{CH}_2)_3\text{-NH}_2$
Ciano	$-(\text{CH}_2)_3\text{-CN}$
Ottadecile detta anche C18	$-(\text{CH}_2)_{17}\text{-CH}_3$
Ottile	$-(\text{CH}_2)_7\text{-CH}_3$

Una volta iniettate le sostanze esse vengono separate dalla colonna e vengono rilevate con speciali detector che possono essere spettrofotometri UV-Vis, spettrofotometri IR, rifrattometri elettronici, fluorimetri ecc. Analogamente a quanto visto per la gascromatografia si può impiegare il metodo analitico dello standard interno. Il metodo dello standard interno è completo, affidabile e relativamente veloce una volta determinati i tempi di ritenzione relativi e i fattori di correzione.

Lo spettrometro di massa come detector degli strumenti di HRGC e HPLC

Lo spettrometro di massa è un moderno strumento che da solo riesce a realizzare l'analisi chimica qualitativa e quantitativa rilevando analiti con concentrazioni bassissime a livello delle parti per miliardo (ppb = microgrammi di analita in un litro di campione). Se lo spettrometro di massa viene accoppiato a un gascromatografo (**HRGC**) o a un cromatografo liquido ad alte prestazioni (**HPLC**) esso si comporta come un potentissimo detector. Il cromatografo risolve la miscela da analizzare inviando allo spettrometro di massa gli analiti uno per volta. La tecnica analitica strumentale della spettrometria di massa (**MS**) si basa sul principio secondo cui gli ioni nel vuoto subiscono, da parte di un campo magnetico esterno, un'accelerazione che è inversamente proporzionale alla loro massa. Gli ioni aventi una massa minore avranno un tempo di volo minore e una velocità maggiore degli ioni più pesanti (principio di inerzia), inoltre percorreranno una traiettoria maggiormente arcuata. Quindi introducendo un analita nella camera di ionizzazione di uno spettrometro di massa si avrà che le molecole e gli atomi presenti verranno frammentati e ionizzati. La **camera di ionizzazione** produce ioni per mezzo di un filamento metallico che, portato all'incandescenza con una potente corrente elettrica, emette elettroni che ionizzano le molecole e gli atomi del gas da analizzare. Questi frammenti molecolari o atomici portanti una carica (+ o -) vengono introdotti in un condotto semicircolare dove delle pompe potenti hanno praticato il vuoto spinto. Il condotto semicircolare può essere diviso schematicamente in due parti. La prima parte, l'analizzatore, nella quale viene applicato dall'esterno un potente campo elettrico che accelera repentinamente gli ioni. Nella seconda parte è applicato un potente campo magnetico che produce la deviazione semicircolare degli ioni. Il funzionamento dello strumento è paragonabile a quello di un acceleratore di

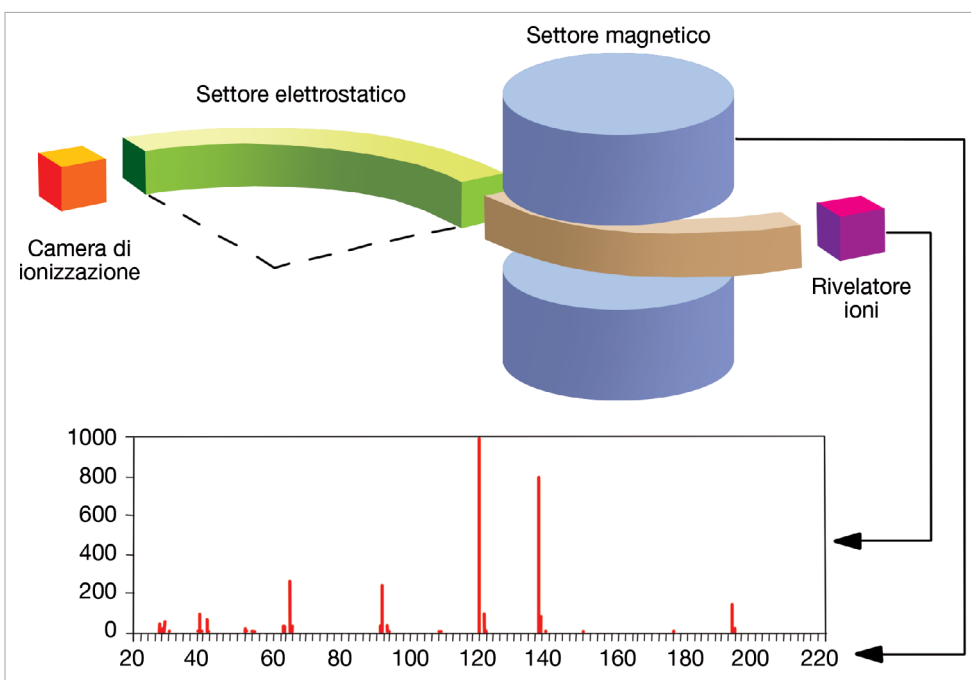


FIGURA 19 Schema di uno spettrometro di massa e di uno spettro di massa

particelle, gli ioni subiscono una forte accelerazione e una deflessione semicircolare. La velocità degli ioni e la loro traiettoria dipende della loro massa, quindi arriveranno sul detector in tempi e con traiettorie diverse. Alla fine del condotto semicircolare si trova un detector (o rivelatore). Il rivelatore è composto da una serie di dinodi, ossia moltiplicatori elettronici che amplificano la corrente debolissima prodotta dagli ioni che superano l'analizzatore.

I segnali prodotti dai dinodi vengono poi trasmessi ad un sistema di elaborazione dei dati che produce il caratteristico spettro di massa della sostanza in esame. I moderni spettrometri di massa sono dotati di computer che hanno in memoria gli spettri di massa di migliaia di composti, quindi è possibile determinare velocemente la sostanza e la sua concentrazione.