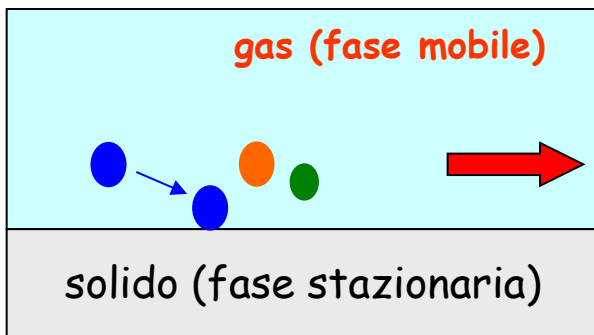


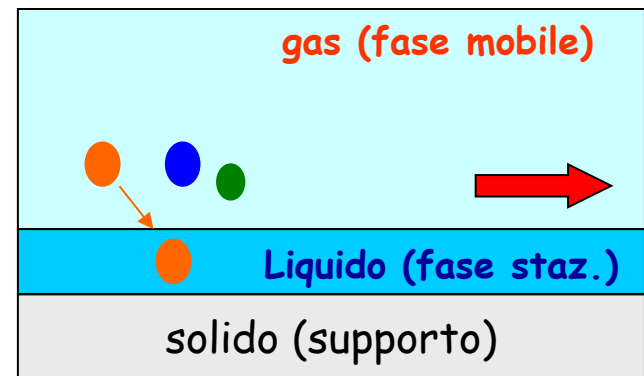
# Gas-cromatografia

In gas-cromatografia la fase mobile è un gas che scorre, all'interno di una colonna, su una fase stazionaria solida o liquida (supportata su un solido), trasportando le molecole degli analiti da separare, anch'essi in fase gassosa:



## Cromatografia gas -solido

L'interazione fra le molecole di analita e la fase stazionaria (solida) è un **adsorbimento**



## Cromatografia gas - liquido

L'interazione fra le molecole di analita e la fase stazionaria (liquida) è una **ripartizione**

## Parametri specifici per la gas cromatografia

**Volume di ritenzione e volume morto:** indicano i volumi di fase mobile che fluiscono all'esterno della colonna in corrispondenza del tempo di ritenzione e del tempo morto rispettivamente:

$$V_R = F t_R$$

$$V_M = F t_M$$

**F** = flusso del gas  
di trasporto

Nei moderni gas cromatografi il flusso del gas di trasporto viene misurato direttamente all'interno, mediante flussimetri basati sulla conducibilità termica dei gas.

**Volumi corretti:**  $V_R$  e  $V_M$  vanno corretti per la caduta di pressione esistente fra l'ingresso ( $P_i$ ) e l'uscita della colonna ( $P$ ):

$$V_R^0 = j F t_R$$

$$V_M^0 = j F t_M$$

con:

$$j = \frac{3[(P_i/P)^2 - 1]}{2[(P_i/P)^3 - 1]}$$

**Volumi di ritenzione specifici ( $V_g$ ) con correzione per la temperatura**

$$V_g = \frac{V_R^0 - V_M^0}{W} \times \left( \frac{273}{T_c} \right)$$

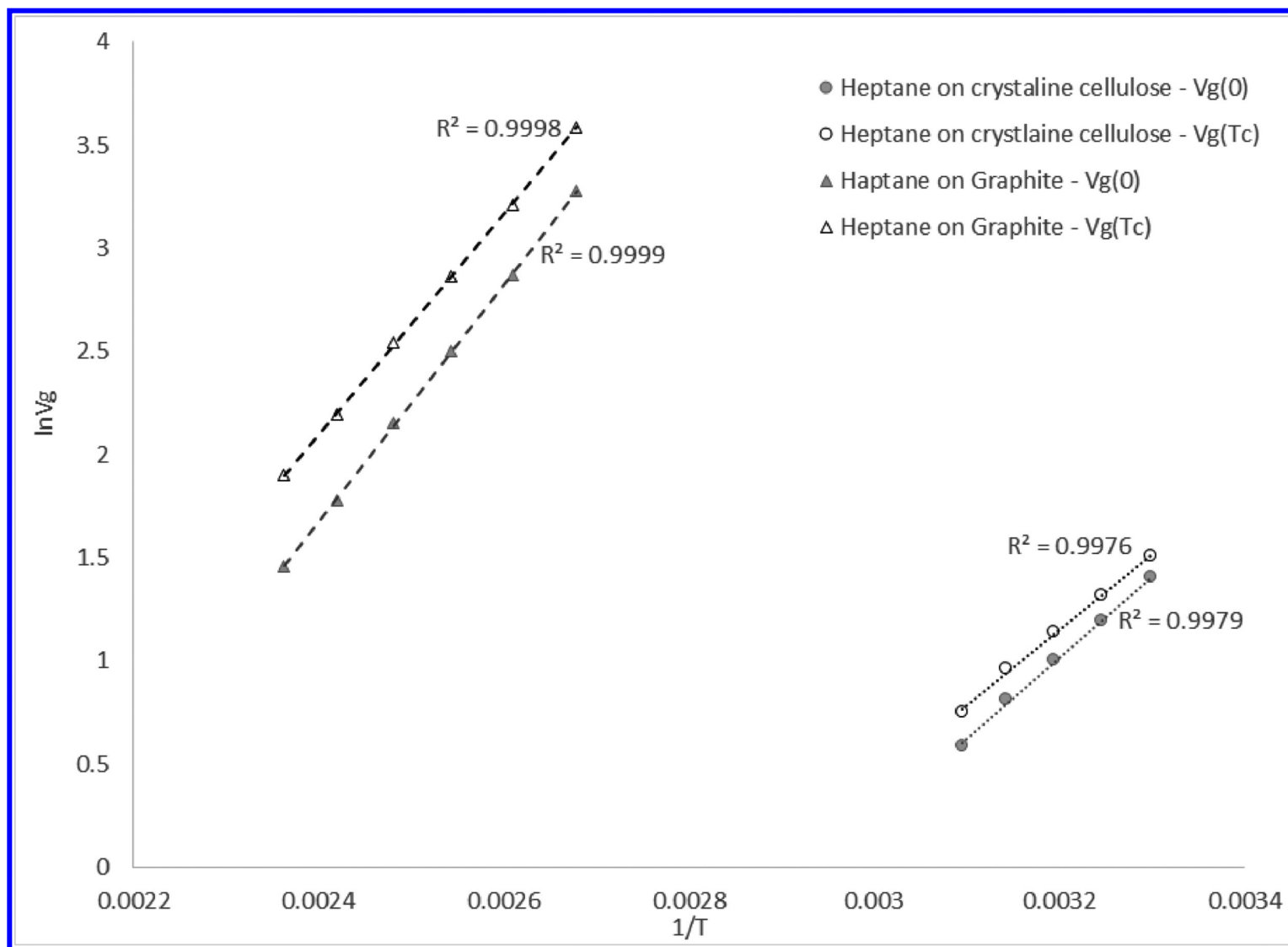
$T_c$  = temperatura della colonna

$W$  = massa della fase stazionaria liquida

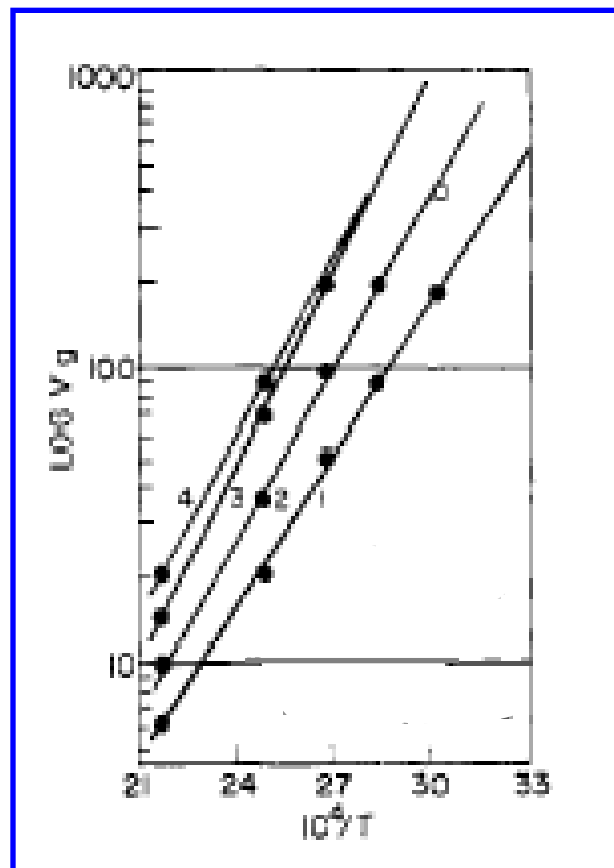
Va sottolineato che, nonostante la correzione per la temperatura, con normalizzazione a 273 K (ossia 0°C) sia tuttora riportata nei manuali IUPAC, alcuni ricercatori nel campo della gas cromatografia ne hanno recentemente contestato la ragionevolezza, proponendo l'uso dei valori di  $V_g$  senza il fattore riportato fra le parentesi in rosso.

Ciò che si osserva sperimentalmente è, in ogni caso, che i valori di  $V_g$  (o il loro logaritmo) dipendono linearmente da  $1/T_c$ ; la pendenza della retta ottenuta dipende dalla costante dell'equilibrio di ripartizione.

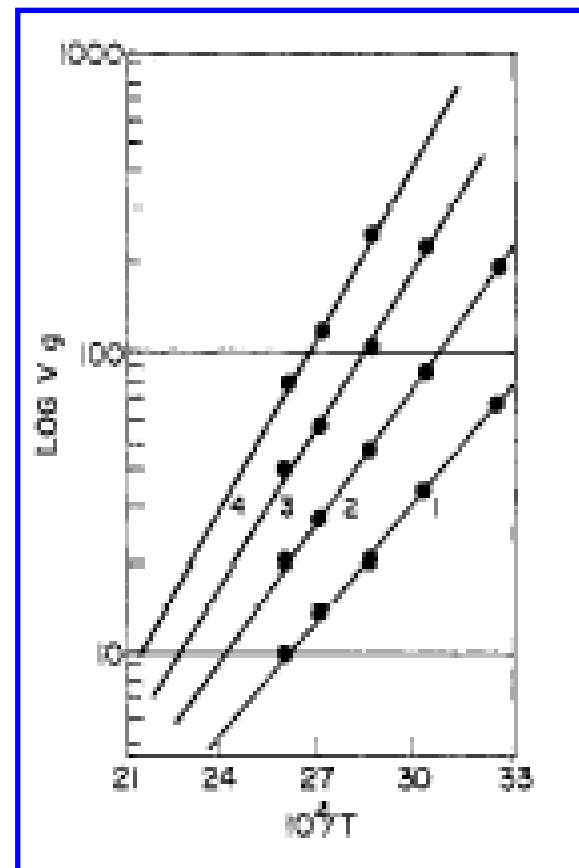
Confronto fra gli andamenti dei valori di  $V_g$  in funzione di  $1/T_c$  ottenuti per l'eptano su due diverse fasi stazionarie, corretti o meno per la temperatura effettiva della colonna



# Esempi della dipendenza di $V_g$ dalla temperatura della colonna per gruppi di analiti strutturalmente simili

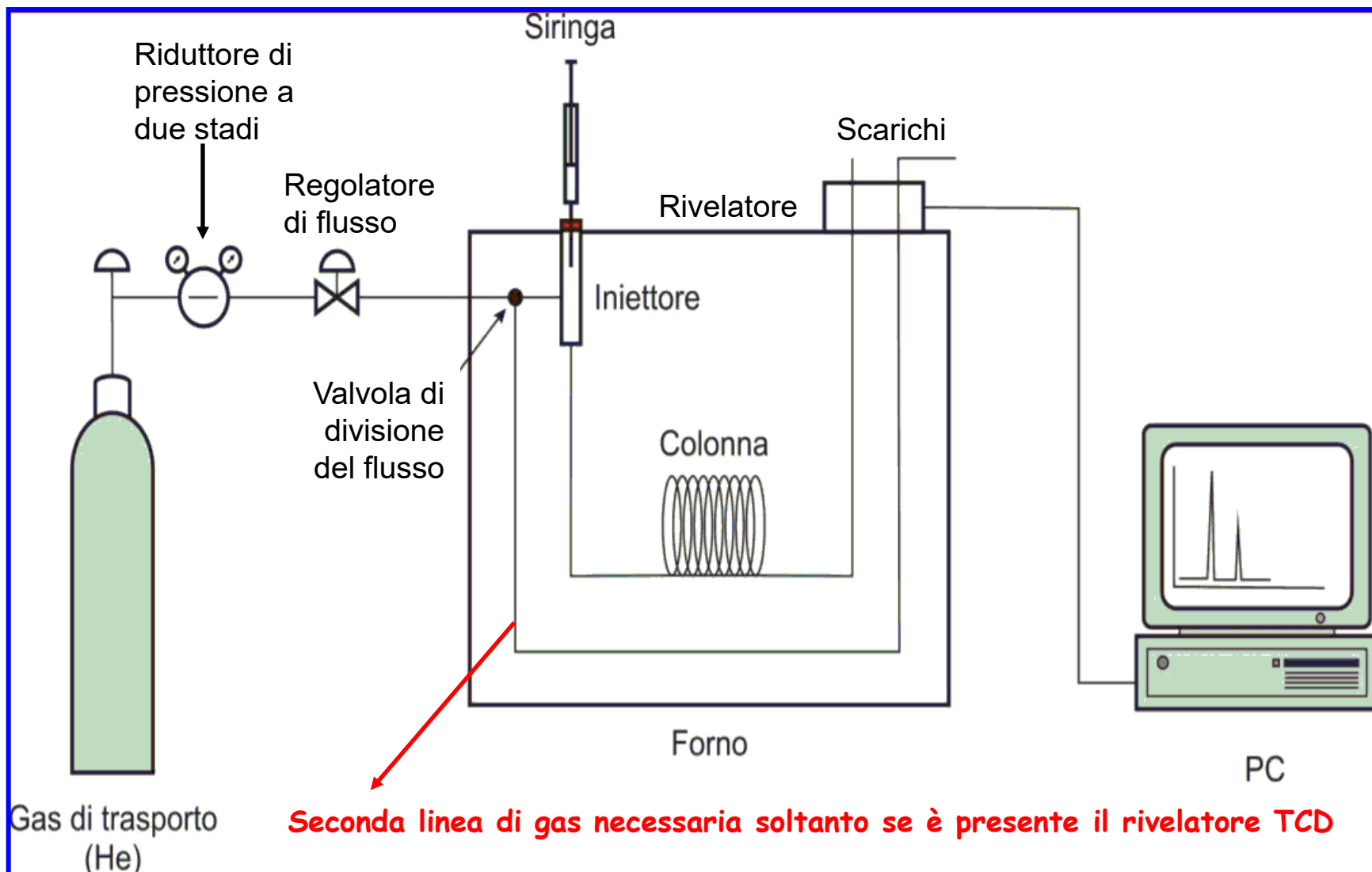


1. Benzene
2. Toluene
3. p-Xilene
4. Isopropil-benzene



1.  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$
2.  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$
3.  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$
4.  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$

# Strumentazione per la gas-cromatografia

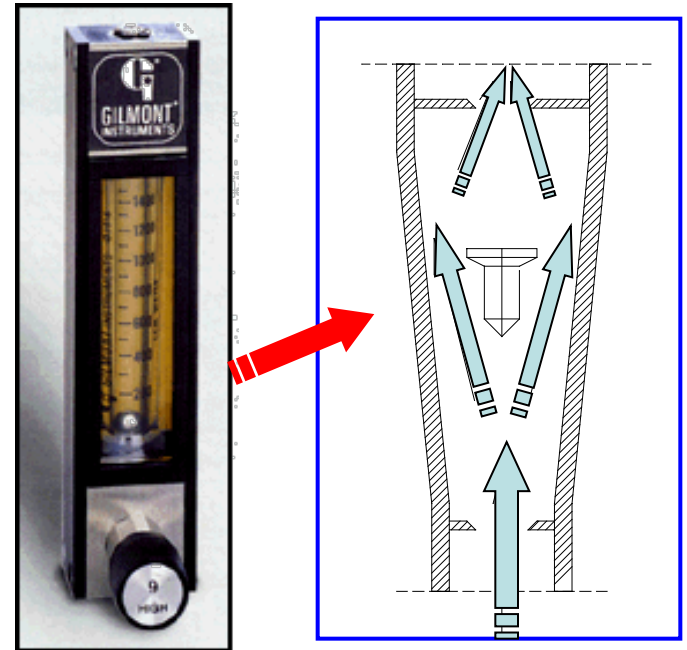


**Schema di gas cromatografo con rivelatore a conducibilità termica (TCD)**

## Misuratori di flusso

### Rotametro

Consente la misurazione del flusso del gas di trasporto in base allo spostamento verticale di un galleggiante (sferico o conico) all'interno di un tubo conico di vetro.



### Flussimetro a bolla di sapone

Il principio è analogo a quello del rotametro ma al posto del galleggiante si usa una bolla creata usando una soluzione saponata posta sul fondo del tubo.

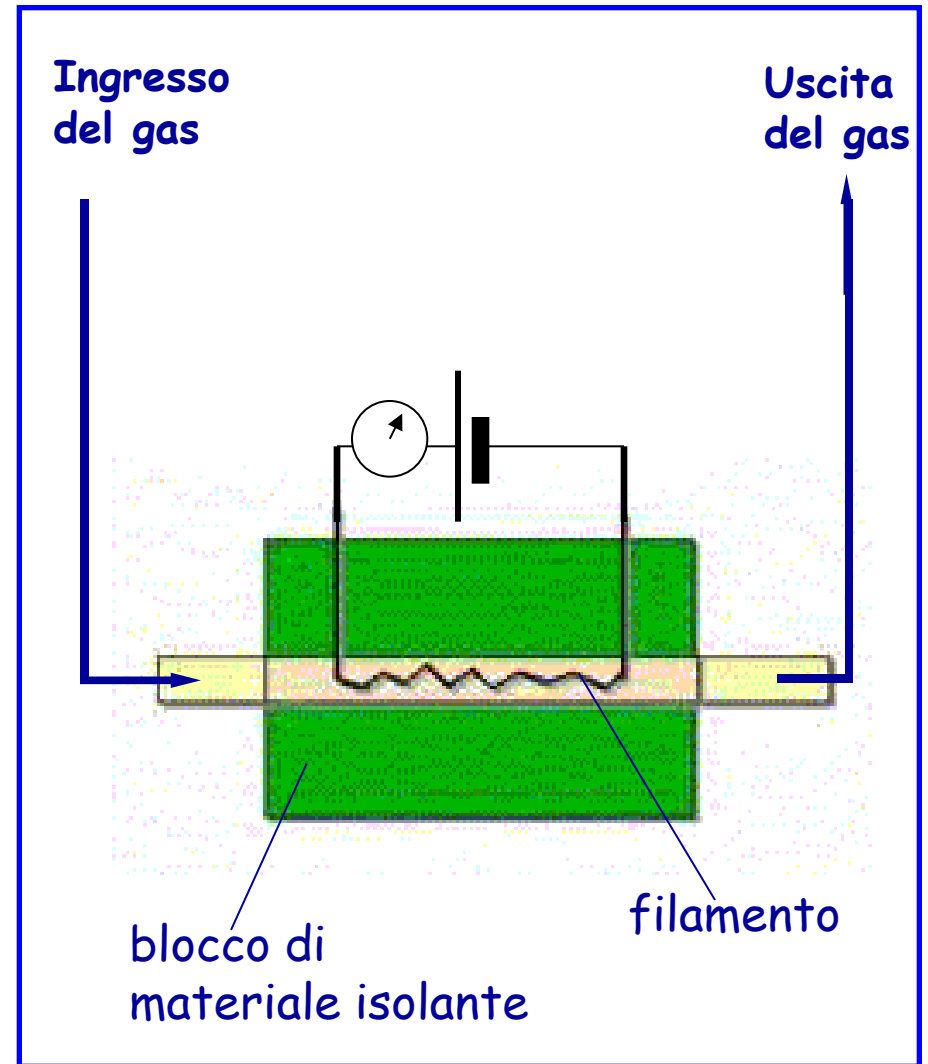
Attualmente viene usato molto meno frequentemente rispetto al passato.



## Flussimetro a conducibilità termica

Il flusso del gas viene misurato indirettamente sfruttando la sua capacità di asportare il calore sviluppato per effetto Joule da un filamento percorso da corrente elettrica.

Se il flusso del gas diminuisce la temperatura del filamento aumenta e con esso la resistenza elettrica, quindi si osserva una diminuzione dell'intensità di corrente nel circuito.



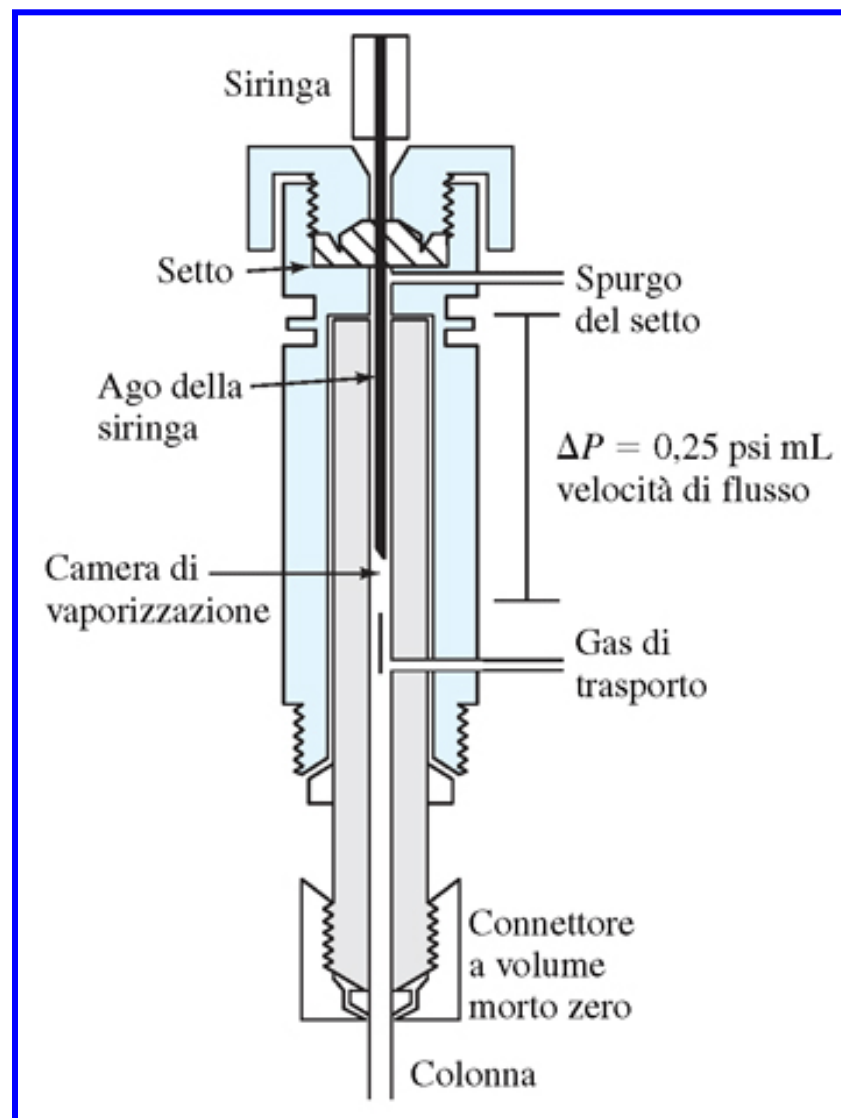


## Sistemi per l'introduzione del campione

### Iniettore convenzionale

Il campione (da 0.5 a 20  $\mu\text{L}$ ), viene iniettato, usando una speciale siringa, all'interno di un blocco riscaldato, in modo che vaporizzi istantaneamente e venga poi spinto all'interno della colonna cromatografica.

La temperatura dell'iniettore deve essere di almeno 50 °C superiore a quella della colonna.



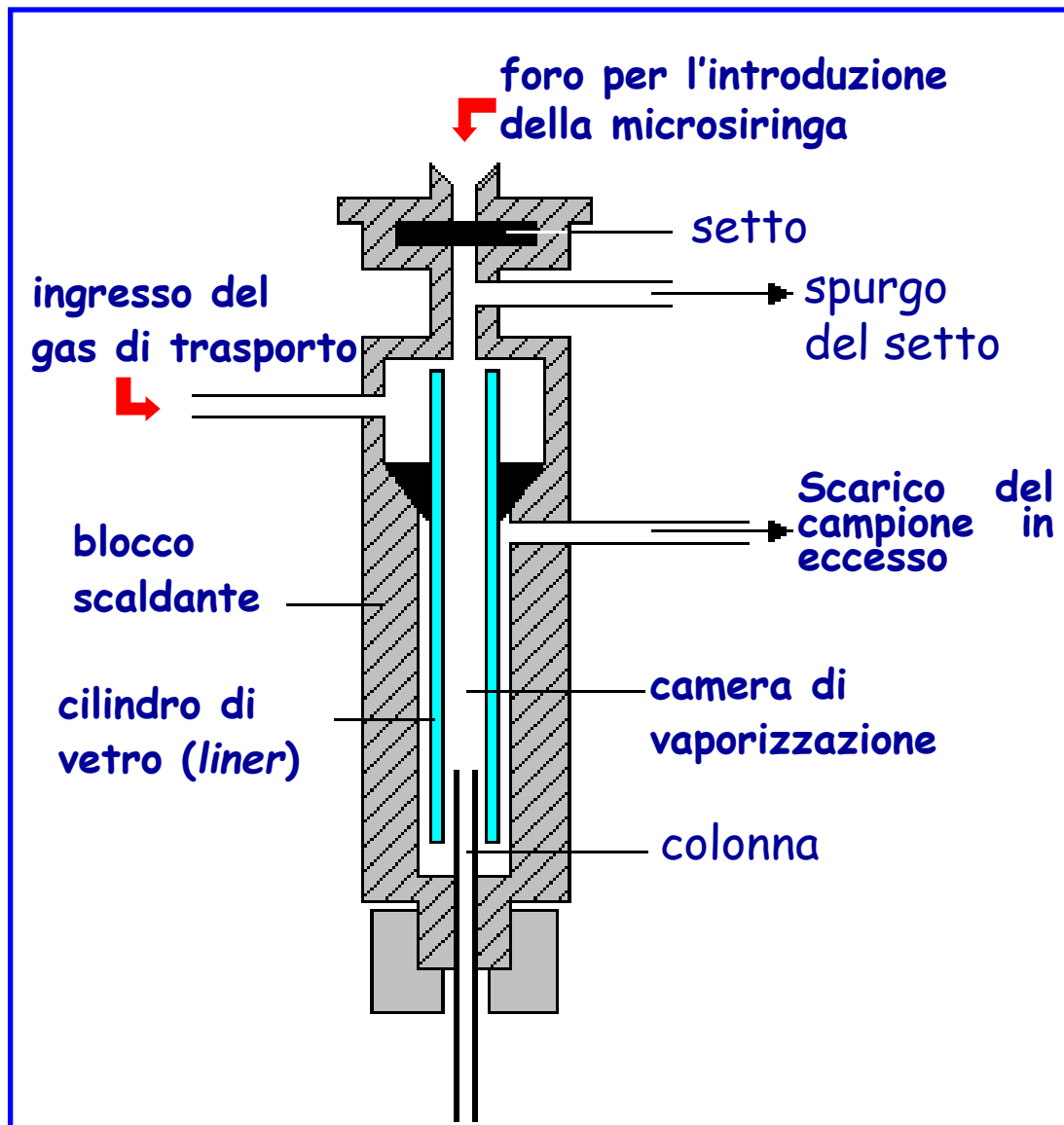
## Iniettore split-splitless

In questo caso una parte del campione può essere scartata (modalità *split*) per evitare sovraccarichi di campione nella colonna.

I volumi in ingresso in colonna in modalità split sono dell'ordine di  $10^{-3} \mu\text{L}$ .

Essa viene adoperata quando si adottano **colonne capillari**.

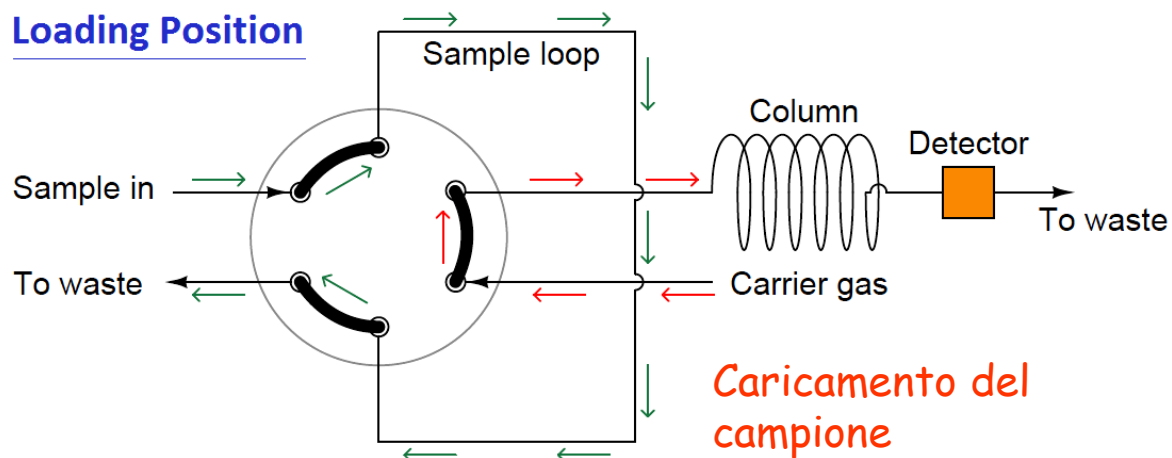
Il liner consente di diminuire il volume a disposizione per l'espansione del vapore derivante dal campione.



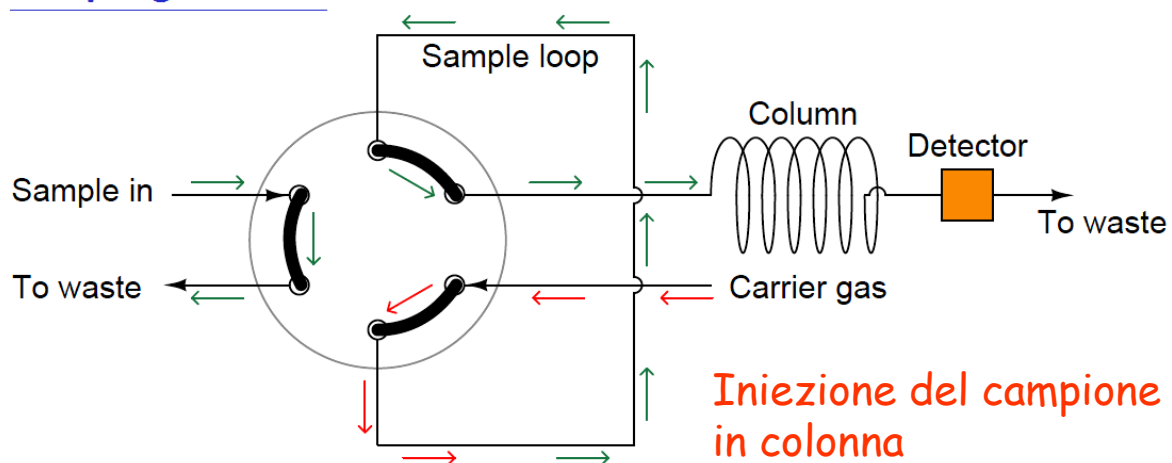
## Valvola di campionamento a 6 vie

Viene impiegata quando il campione da introdurre in colonna è già gassoso e consente di introdurre nella colonna **volumi noti di campione** (corrispondenti al volume del cosiddetto «sample loop») con un errore relativamente piccolo (1-2%), inferiore a quello che normalmente si commette con una microsiringa.

### Loading Position



### Sampling Position



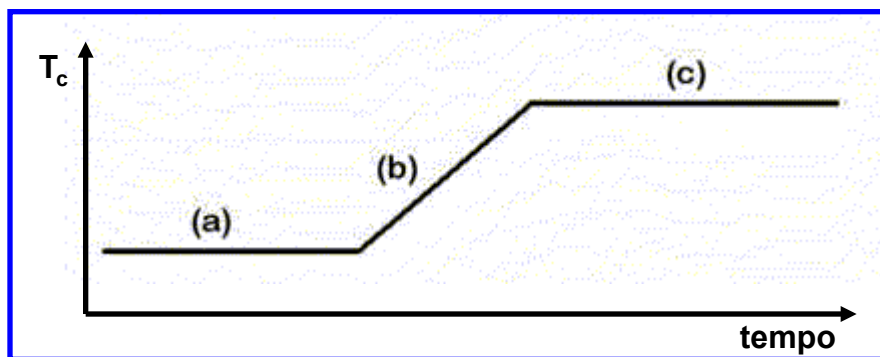
## Controllo della temperatura della colonna in gas-cromatografia

Come evidenziato in precedenza, la temperatura della colonna ha un'influenza notevole sul volume (e quindi sul tempo) di ritenzione di un analita in una specifica colonna (ossia fissata la fase stazionaria).

Una separazione gas cromatografica può essere condotta in due modalità:

isotermica  $\Rightarrow T_c$  costante

a temperatura programmata (gradiente di temperatura)

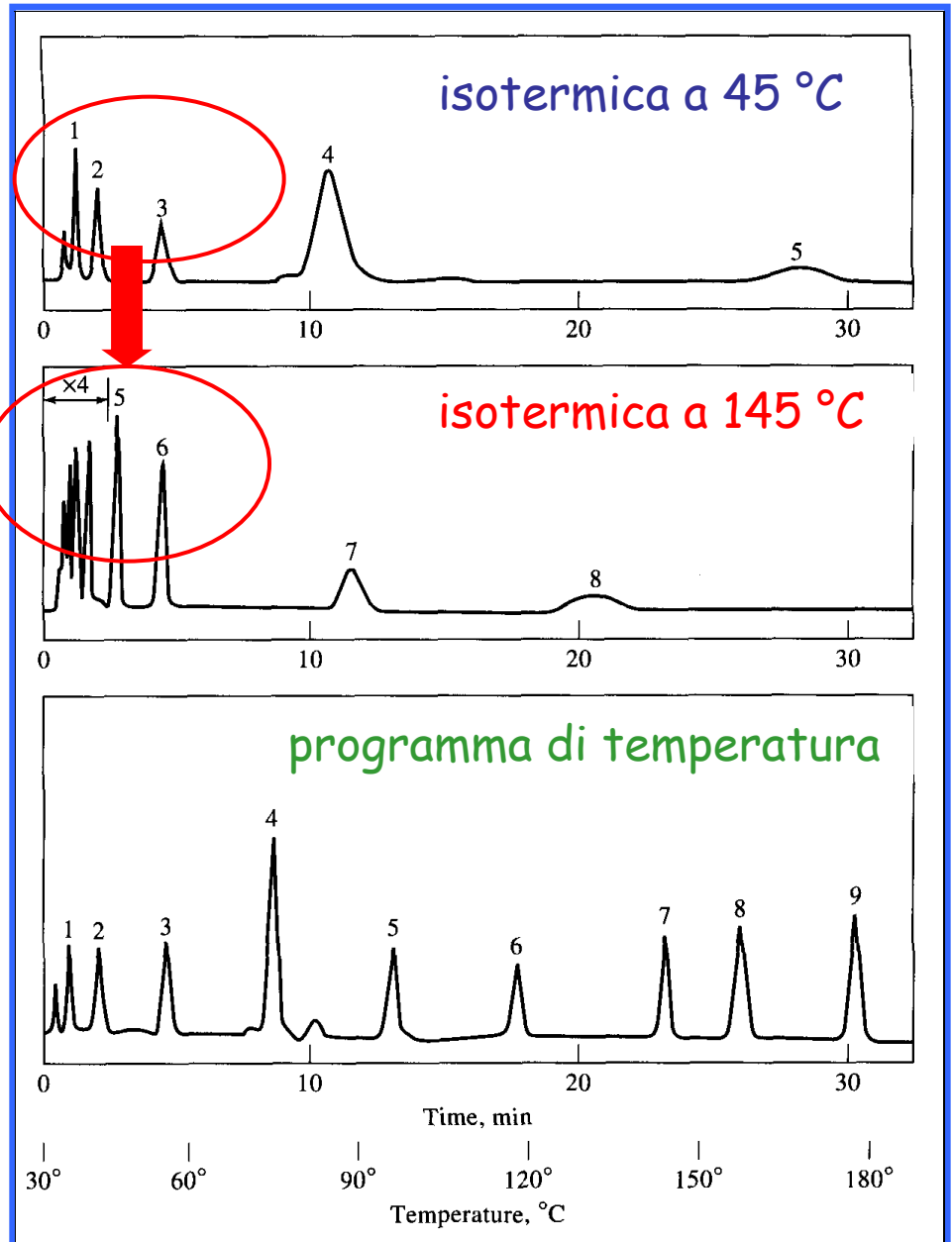


- a) temperatura iniziale
- b) rampa di temperatura ( $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ )
- c) temperatura finale

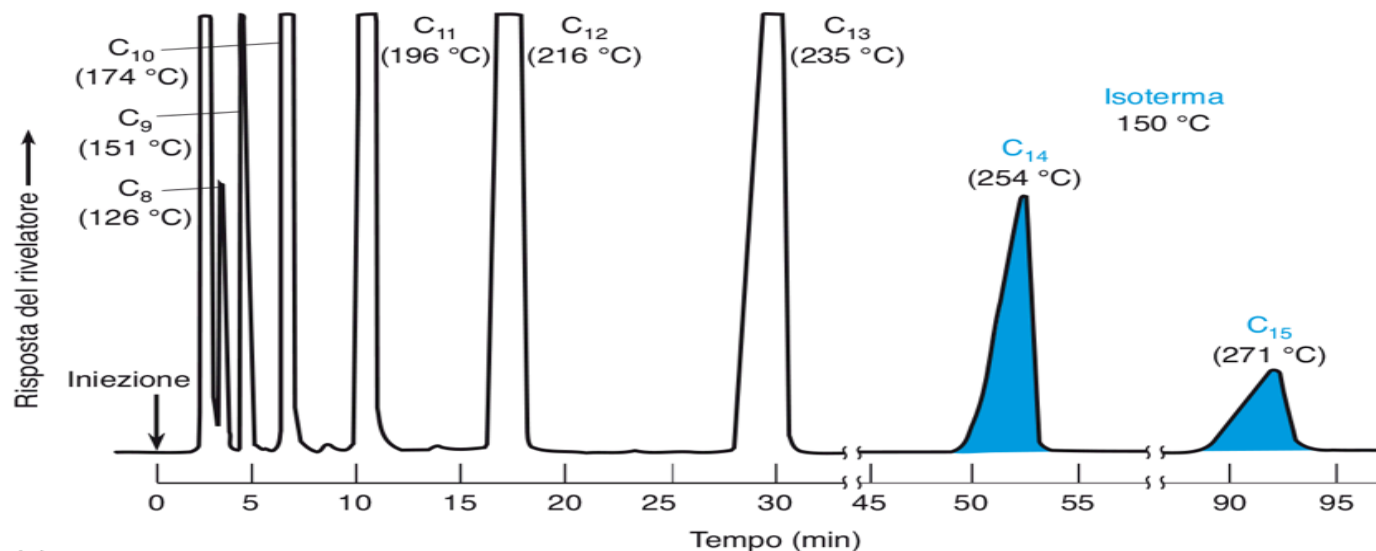
Confronto fra separazione gas cromatografica isoterma e a temperatura programmata.

In condizioni isotermeche la risoluzione migliora abbassando la temperatura ma i tempi di analisi diventano eccessivamente lunghi.

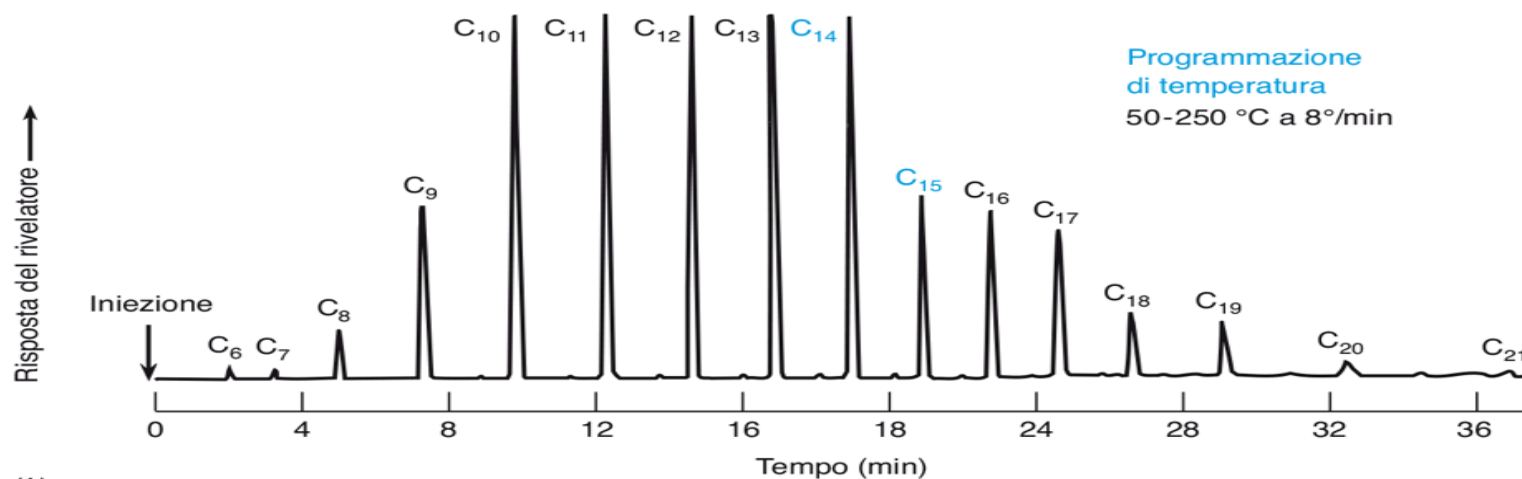
Con un programma di temperatura è possibile raggiungere un buon compromesso fra risoluzione e tempo complessivo di analisi.



## Confronto fra una separazione gas cromatografica isoterma e una a temperatura programmata per alcani a catena lineare



(a)



(b)

## Rivelatori in gas-cromatografia

### Parametri caratteristici di un rivelatore in gas cromatografia

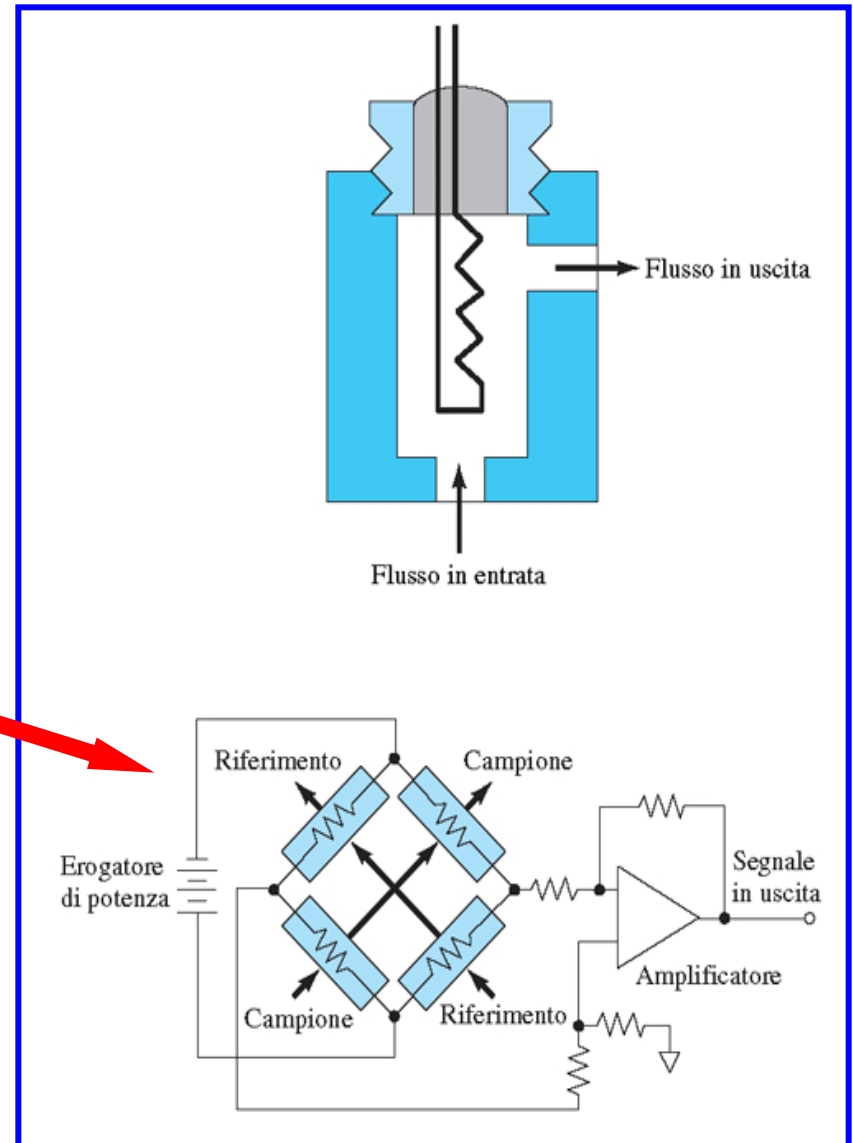
1. Range dinamico
2. Intervallo di risposta lineare
3. Sensibilità e limite di rivelabilità
4. Selettività
5. Dispersione (quantifica l'allargamento del picco cromatografico dovuto al suo passaggio nel rivelatore)
6. Dimensioni del rivelatore
7. Tempo di risposta
8. Variabilità della risposta a variazioni di flusso e pressione
9. Intervallo di temperatura operativo

## Rivelatore a conducibilità termica (TCD)

Il passaggio dell'analita all'interno del gas di trasporto (di solito **idrogeno** o **elio**), modifica la conducibilità termica di quest'ultimo, producendo una variazione della temperatura, e quindi della conducibilità elettrica, di un filamento percorso da corrente.

La variazione di conducibilità viene valutata dallo sbilanciamento di un **ponte di Wheatstone**

Il TCD è naturalmente un rivelatore **non selettivo**.



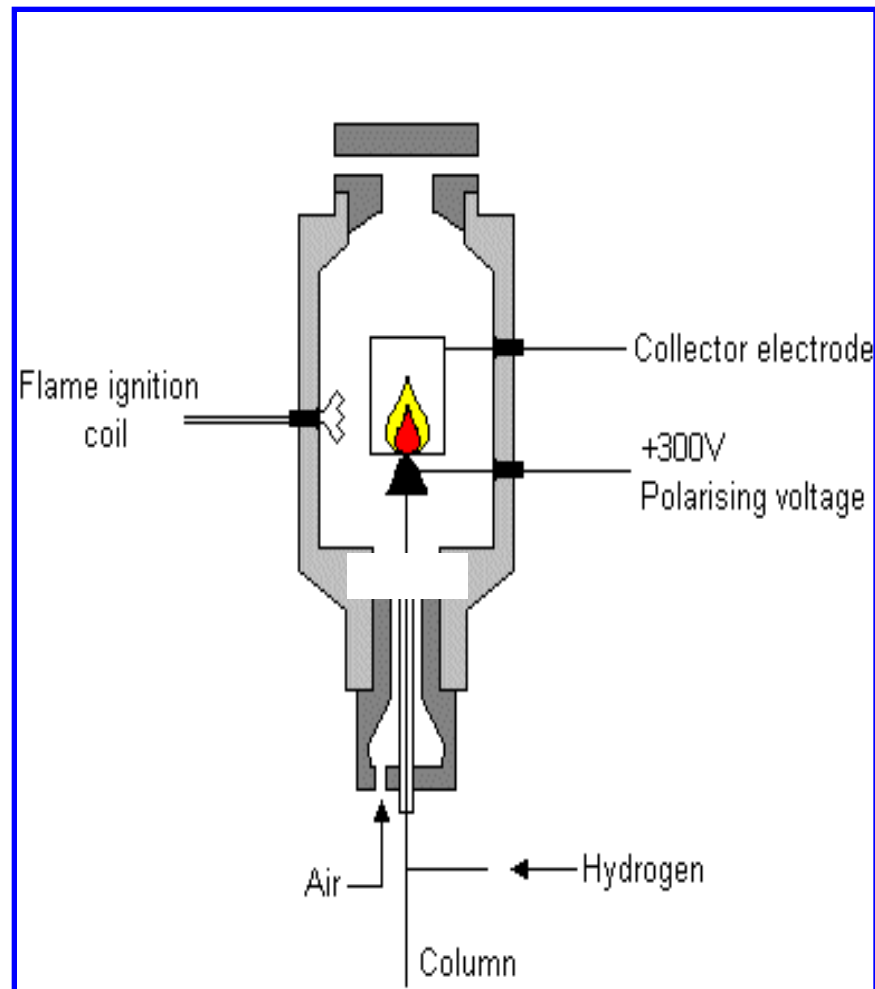


## Rivelatore a ionizzazione in fiamma (FID)

La rivelazione si basa sull'aumento della conducibilità elettrica provocato dalla formazione di ioni in seguito alla combustione dell'analita presente nel gas di trasporto.

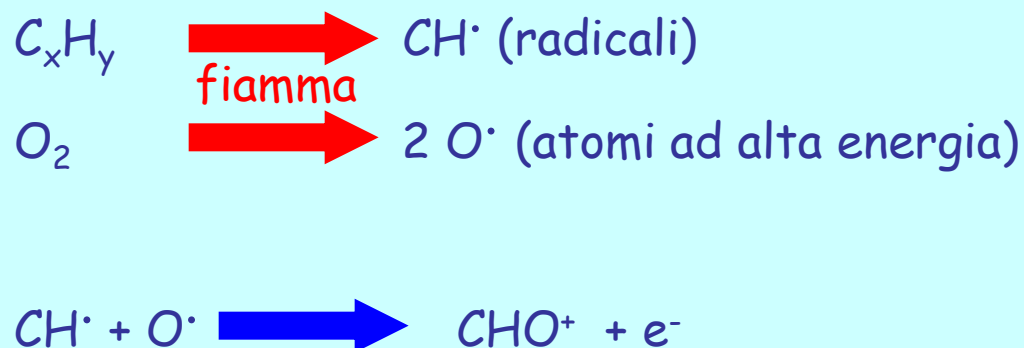
E' sensibile soprattutto ai composti idrocarburici.

Non è sensibile ai composti inorganici del carbonio ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{CO}$ , ecc.), né ad altri composti inorganici ( $\text{NH}_3$ ,  $\text{SO}_2$ ,  $\text{NO}_x$ ), ai gas nobili e ad  $\text{H}_2$  ed  $\text{N}_2$ .



## Meccanismo di formazione di ioni nel FID

Poiché la temperatura della fiamma (< 2000 °C) non è sufficiente a ionizzare molecole organiche, si ipotizza che il meccanismo di formazione di ioni a partire da queste sia di natura diversa:

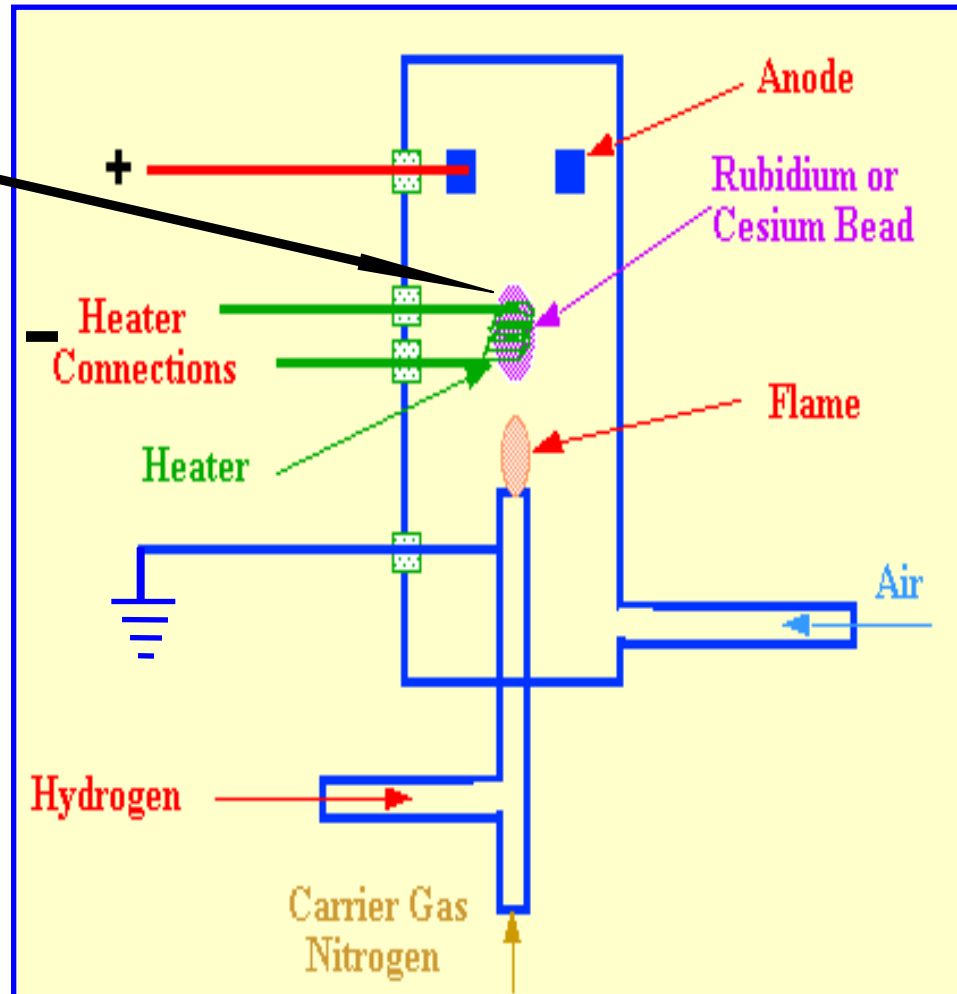


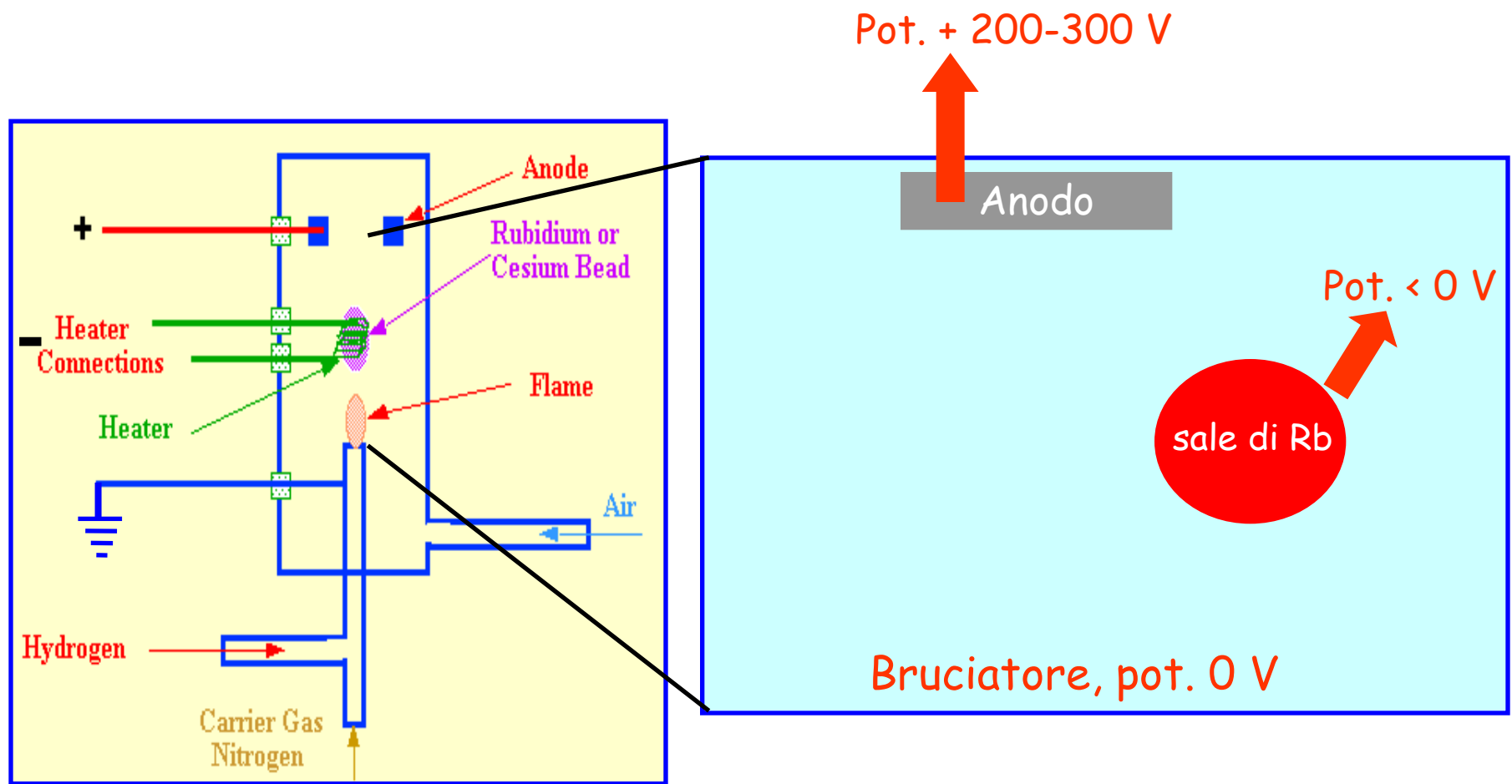
Gli ioni  $\text{CHO}^+$  e gli elettroni liberati nella fiamma consentono di registrare correnti dell'ordine di  $10^{-9}/10^{-12}$  A, mentre quelle di fondo, registrate al passaggio della sola fase mobile (di solito  $\text{H}_2$ ), sono 100-10000 volte inferiori.

## Rivelatore a ionizzazione in fiamma termoionico (rivelatore azoto-fosforo, NPD)

Rispetto al FID è provvisto di una perlina costituita da un sale di Rb o Cs, riscaldata a 600-800 °C, dove avviene la liberazione di ioni  $\text{Rb}^+/\text{Cs}^+$ :  $\text{Rb} \rightleftharpoons \text{Rb}^+ + \text{e}^-$

La perlina è mantenuta ad un potenziale più negativo di quello del bruciatore (di solito collegato a terra).



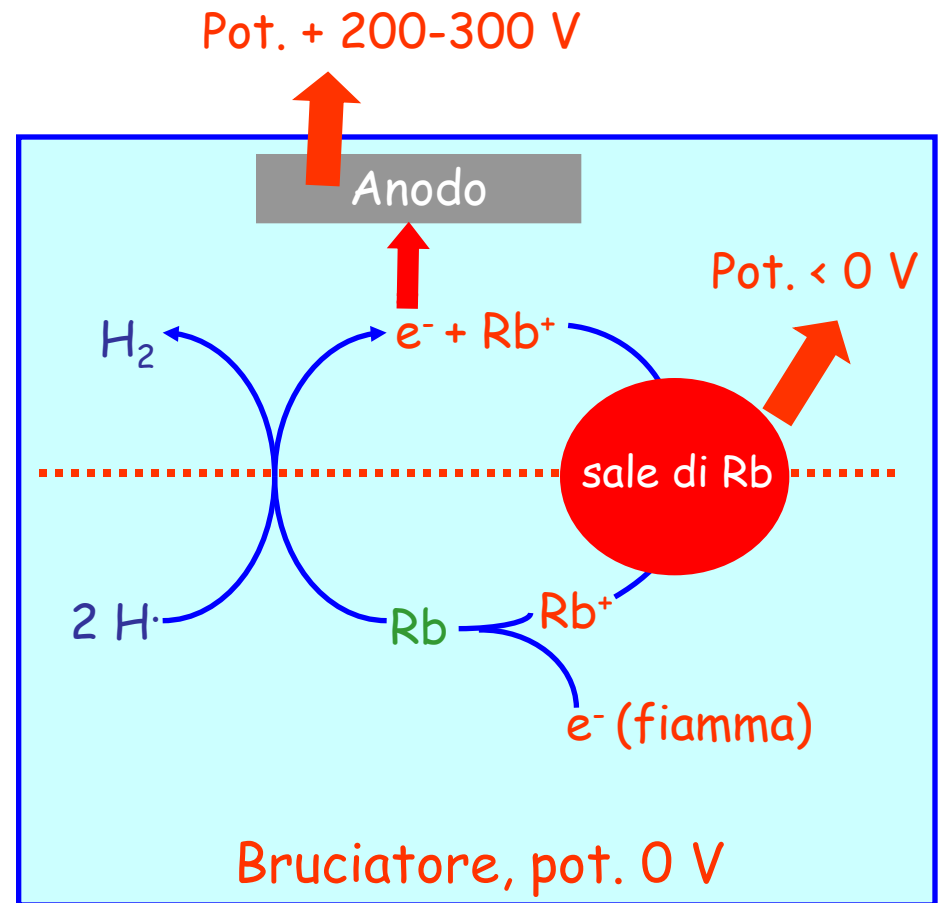


I potenziali dei tre elettrodi dell'NPD sono studiati appositamente per aumentare la selettività del rivelatore.

L'applicazione di un potenziale negativo alla perlina, infatti, fa sì che le specie  $\text{CHO}^+$  prodotte per combustione nella fiamma dai semplici composti idrocarburici (come nel FID) vadano a scaricarsi sulla perlina e non sul collettore, che in questo caso è un anodo mentre nel FID è un catodo.

## Meccanismo di interazione in fase omogenea per l'NPD: passaggio del solo gas di trasporto

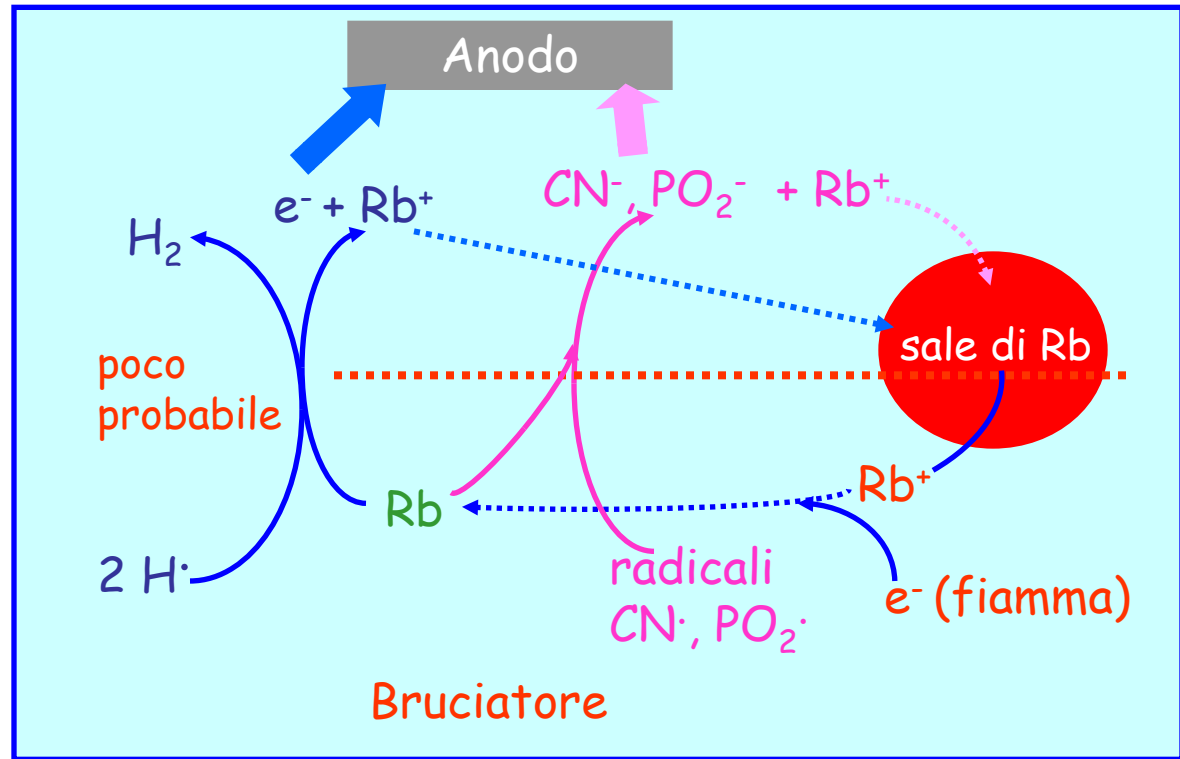
Quando dalla colonna eluisce soltanto il gas di trasporto si generano elettroni derivanti da un processo a tre corpi che coinvolge **un atomo di Rb** liberato dalla perlina (o formatosi in modo transiente dall'interazione fra un elettrone derivante dalla fiamma e ioni  $\text{Rb}^+$ ) e **due radicali  $\text{H}\cdot$**  derivanti dalla fiamma:



Il processo a tre corpi è statisticamente poco probabile ma quando avviene consente, di fatto, di portare un elettrone nel semispazio superiore rispetto alla perlina, permettendone la scarica all'anodo. **Al contrario gli elettroni prodotti nel semispazio inferiore si scaricano sul bruciatore.**

## Meccanismo di interazione in fase omogenea per l'NPD: eluizione di composti organici azotati e/o fosforati

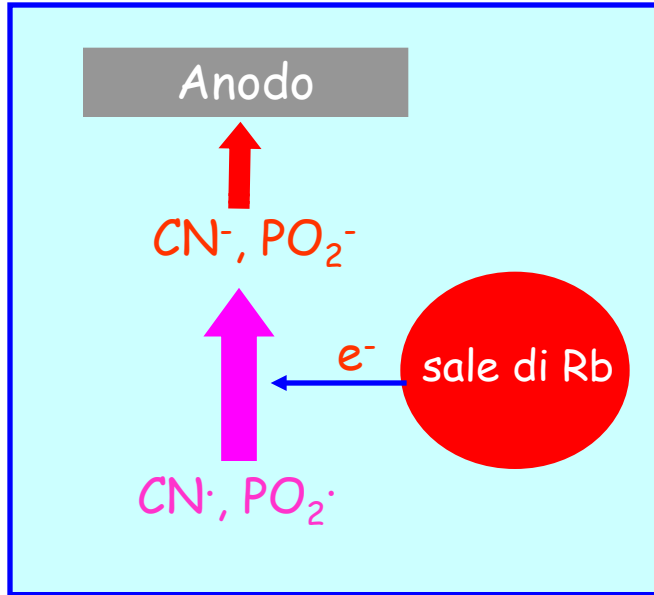
Se dalla fiamma arrivano **anche** (quindi l'H radicalico arriva comunque) **radicali  $CN^\cdot$  e  $PO_2^\cdot$** , generati dalla combustione di **composti organici azotati/ fosforati**, si verifica una competizione con i radicali H per il rubidio atomico.



Il processo più probabile è di gran lunga quello a due corpi, anche in virtù dell'ottima combinazione fra **potenziale di ionizzazione del rubidio** e **affinità elettronica dei radicali  $CN^\cdot$  e  $PO_2^\cdot$** . Da questi si formeranno dunque ioni negativi  $CN^-$  e  $PO_2^-$ , che si scaricheranno all'anodo generando una corrente molto più alta della precedente.

Anche in questo caso si forma  $Rb^+$  che torna alla perlina.

## Meccanismo di interazione in fase eterogenea per l'NPD



Secondo questo modello, **elettroni** vengono rilasciati dalla perlina per **effetto termoionico** ed interagiscono con i radicali  $\text{CN}\cdot$  e  $\text{PO}_2\cdot$  trasformandoli in ioni negativi che poi raggiungono l'anodo.

In questo caso si ammette dunque la cattura diretta di elettroni, non mediata dal rubidio, da parte dei radicali azotati o fosforati.

Di fatto è un **meccanismo complementare al precedente**.

## Rivelatore a cattura di elettroni (ECD)

Una sorgente di radiazioni  $\beta$  (emesse da tritio o  $\text{Ni}^{63}$ ) provoca la ionizzazione del gas di trasporto:



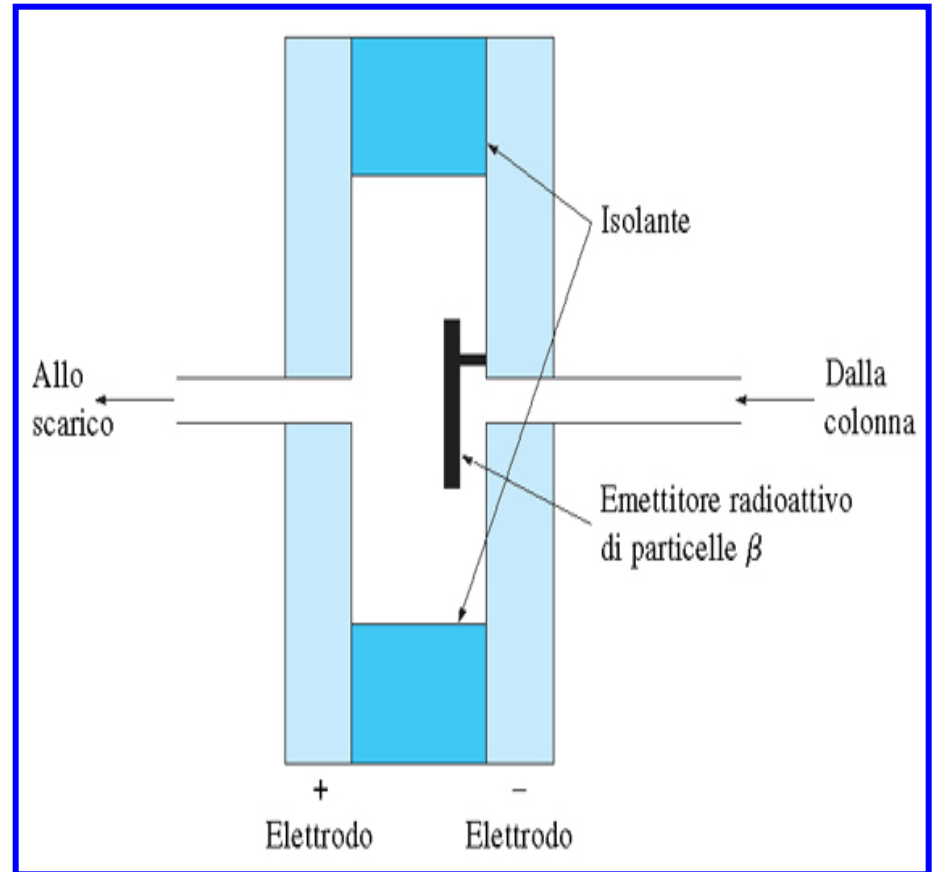
Analiti (X) con elevata affinità elettronica possono catturare gli elettroni:



La ricombinazione fra ioni  $\text{N}_2^+$  e  $\text{X}^-$  è  $10^5$ - $10^8$  volte più probabile di quella fra  $\text{N}_2^+$  ed elettroni.



Si osserva una diminuzione di corrente al passaggio di analiti elettrone-affini.





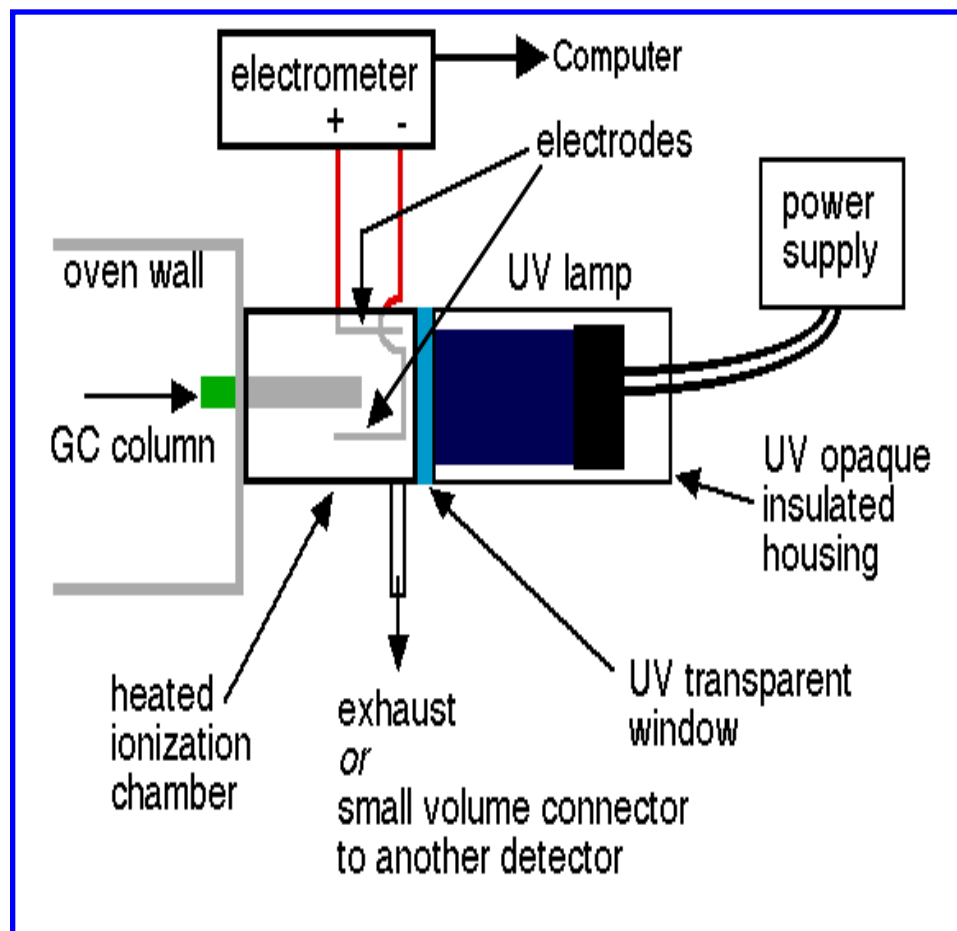
## Rivelatore a fotoionizzazione (PID)

In questo caso la ionizzazione delle specie eluenti dalla colonna GC avviene per esposizione a radiazione UV ad alta energia:



Tipicamente la radiazione non è in grado di ionizzare i costituenti dell'aria ( $N_2$ ,  $O_2$ ,  $CO_2$ ,  $H_2O$ ).

Il PID è invece sensibile alla maggior parte dei **composti organici (RH)**.



Il responso del PID dipende dalla concentrazione (e quindi dal flusso).

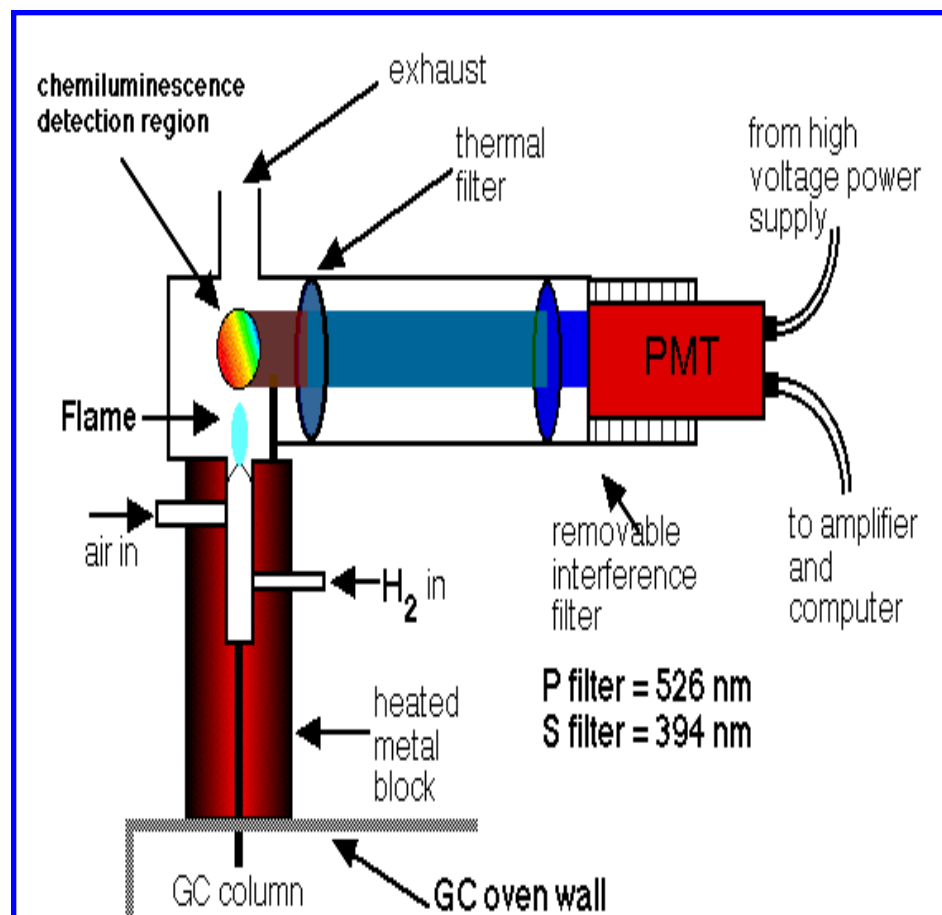
## Rivelatore a fotometria in fiamma (FPD)

Nel rivelatore FPD la presenza dell'analita viene rivelata dall'emissione di radiazione nella fiamma in cui viene bruciato il gas proveniente dalla colonna gascromatografica.

In particolare vengono rivelati composti contenenti:

fosforo (emissione a 526 nm)

zolfo (emissione a 394 nm)



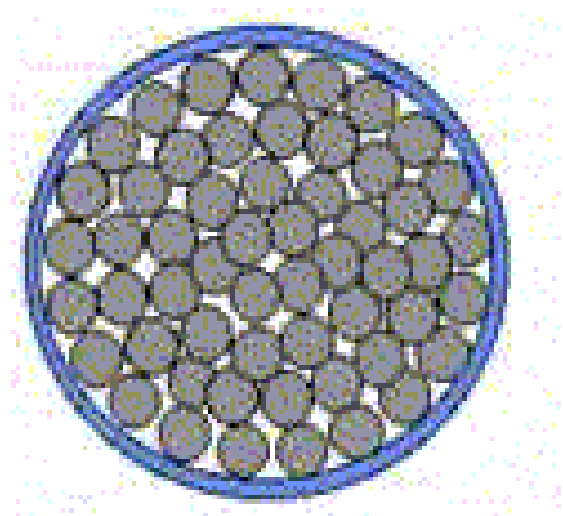
## Confronto fra i principali rivelatori in GC

Detector	Selettività	Sensibilità	Linearità	Gas	Temperatura
TCD	nessuna	5-20 ng	$10^5$	H <sub>2</sub> o He	150-250 °C
FID	composti organici	0.1-10 ng	$10^7$	H <sub>2</sub> e aria	250-300 °C
NPD	composti con N composti con P	10 pg 1 pg	$10^6$	H <sub>2</sub> e aria	250-300 °C
ECD	composti alogenati carbonilici coniugati	0.1-10 pg 0.1 - 1 ng	$10^4$	N <sub>2</sub>	300 - 400 °C
PID	composti aromatici olefine	25-50 pg 50-200 pg	$10^7$	trasp.	200 °C
FPD	composti con S composti con P	10-100 pg 1-10 pg	$10^3$ $10^4$	H <sub>2</sub> e aria	250 - 300 °C

## Tipi di colonne e fasi stazionarie in gas-cromatografia

### Colonne impaccate

sono costituite da tubi di **vetro**, **metallo o teflon**, di lunghezza 2-3 m e diametro interno 2-4 mm, riempiti con particelle di un materiale solido finemente suddiviso (ad esempio terra di diatomee) e ricoperto da una sottile (0.05-1 mm) pellicola di fase stazionaria liquida



## Colonne capillari (tubolari aperte)

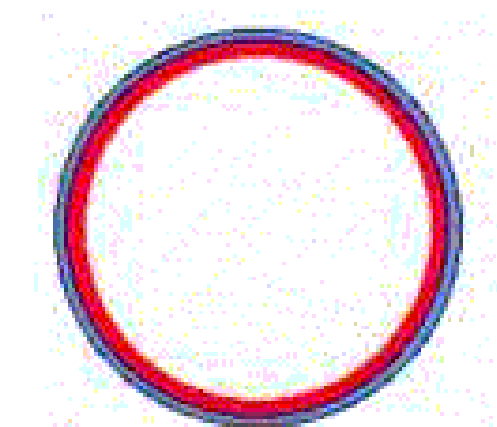
### Support Coated Open Tubular (SCOT)

uno strato sottile (circa 30 nm) di materiale di supporto (ad es. terra di diatomee) ricopre le pareti interne della colonna ed è a sua volta ricoperto di fase stazionaria



### Wall Coated Open Tubular (WCOT)

la fase stazionaria ricopre le pareti interne della colonna, come film sottile



## Fused Silica Open Tubular (FSOT)

Sono particolari tipi di colonne WCOT realizzate in silice fusa protetta da un rivestimento esterno di poliimide, di diametro interno 100-300  $\mu\text{m}$ .

L'eccellente flessibilità permette di ottenere colonne di lunghezza fino a 100 m!

Sono ormai le colonne più diffuse in gas-cromatografia.



Immagine che mostra una colonna di tipo FSOT montata all'interno del forno di un gas cromatografo.



## Confronto fra le colonne impiegate in GC

	Tipo di colonna			
	FSOT	WCOT	SCOT	Impaccata
Lunghezza / m	10-100	10-100	10-100	1-6
Diametro interno / mm	0.1-0.3	0.25-0.75	0.5	2-4
Efficienza, piatti/ m	2000-4000	1000-4000	600-1200	500-1000
Dimensione del campione / ng	10-75	10-1000	10-1000	10-10 <sup>6</sup>
Pressione	Bassa	Bassa	Bassa	Alta
Velocita'	Alta	Alta	Alta	Bassa
Inerzia chimica	Elevata  Bassa			
Flessibilita'	Si'	No	No	No



## Materiale di supporto per la fase stazionaria in GC

### Caratteristiche fondamentali

- ✓ Elevato rapporto area superficiale/massa
- ✓ Distribuzione regolare delle dimensioni delle particelle
- ✓ Buona conducibilità termica
- ✓ Stabilità meccanica e termica

Il materiale di supporto in assoluto più usato è costituito da **terre di diatomee calcinate (Chromosorb)**, costituite dai residui fossili di alghe microscopiche.

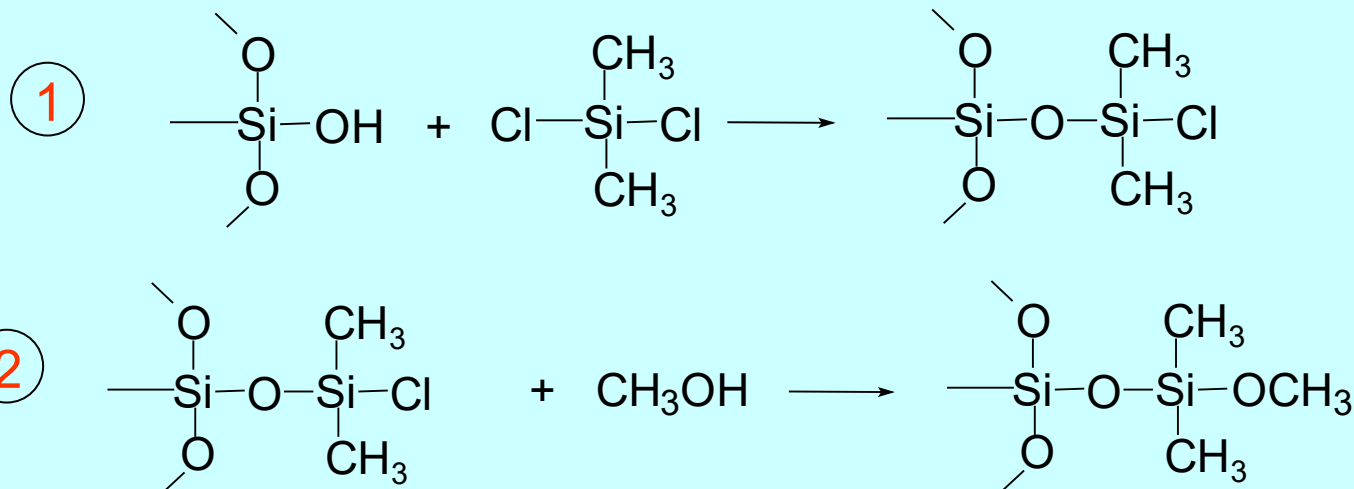
La loro **composizione tipica** è:

**SiO<sub>2</sub> (91%)**, **Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (4.6%)**, **Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (1.9 %)**, **CaO (1.4%)**, **MgO ( 0.4 %)**

## End-capping del materiale di supporto

I gruppi silanolici (Si-OH) presenti alla superficie dei granuli di Chromosorb devono essere derivatizzati con gruppi apolari per aumentare la stabilità termica e soprattutto impedire il verificarsi di fenomeni di adsorbimento degli analiti sul materiale di supporto, con conseguente asimmetria dei picchi cromatografici.

Le reazioni di derivatizzazione fanno uso di **dimetil-dicloro-silani**:



## Fasi stazionarie impiegate in gas-cromatografia

### Cromatografia di adsorbimento (o gas-solido, GSC)

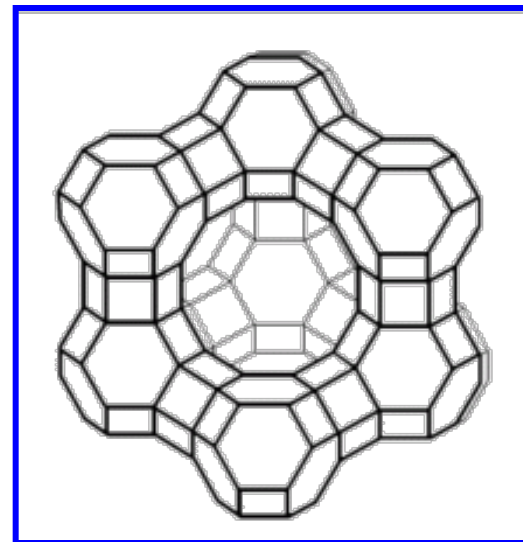
Si preferisce sfruttare l'adsorbimento per l'interazione con la fase stazionaria per analiti molto volatili (azoto, ossigeno, gas nobili, ossidi di azoto e di carbonio, solfuri di idrogeno e carbonio).

I materiali più impiegati sono:

- ❖ Carboni attivi e carboni grafitati
- ❖ Allumina e gel di silice
- ❖ Setacci molecolari (zeoliti):

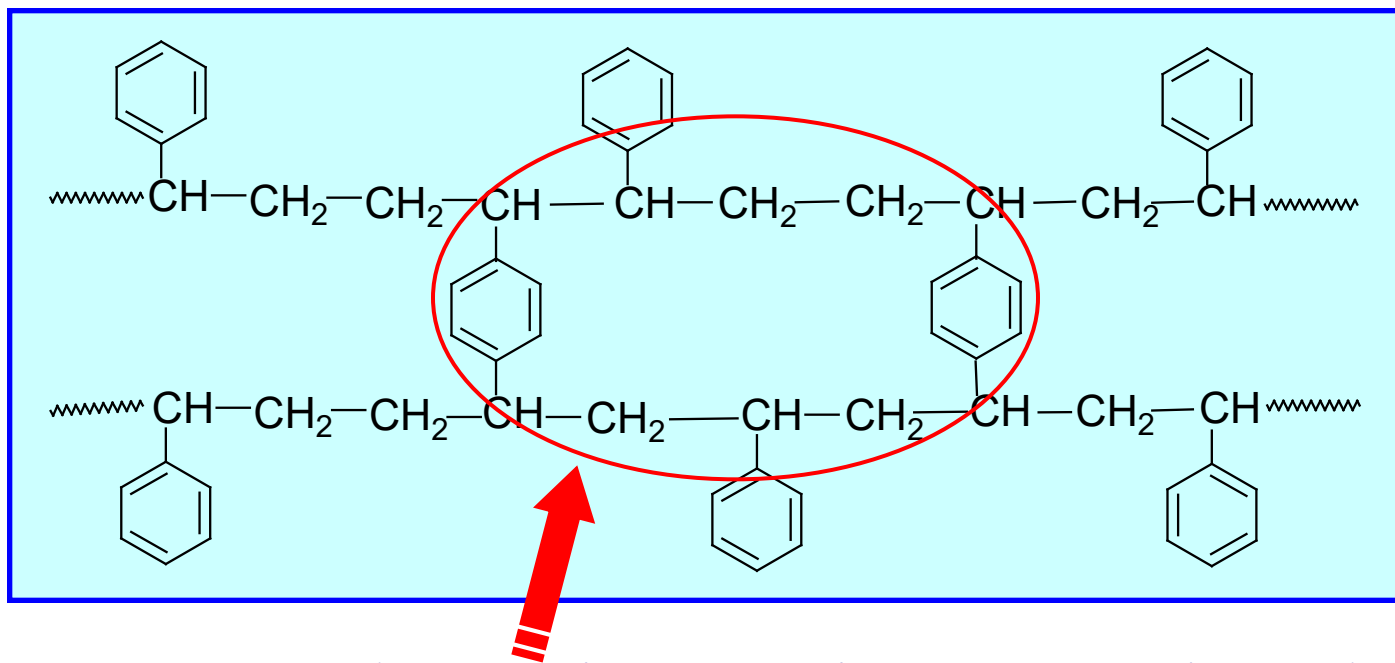
sono silicati e alluminati di metalli alcalini/alcalino-terrosi caratterizzati dalla presenza di cavità di dimensioni molecolari (4-13 Å).

In questo caso le molecole più piccole saranno ritenute più a lungo sulla fase stazionaria.



## ❖ Polimeri porosi

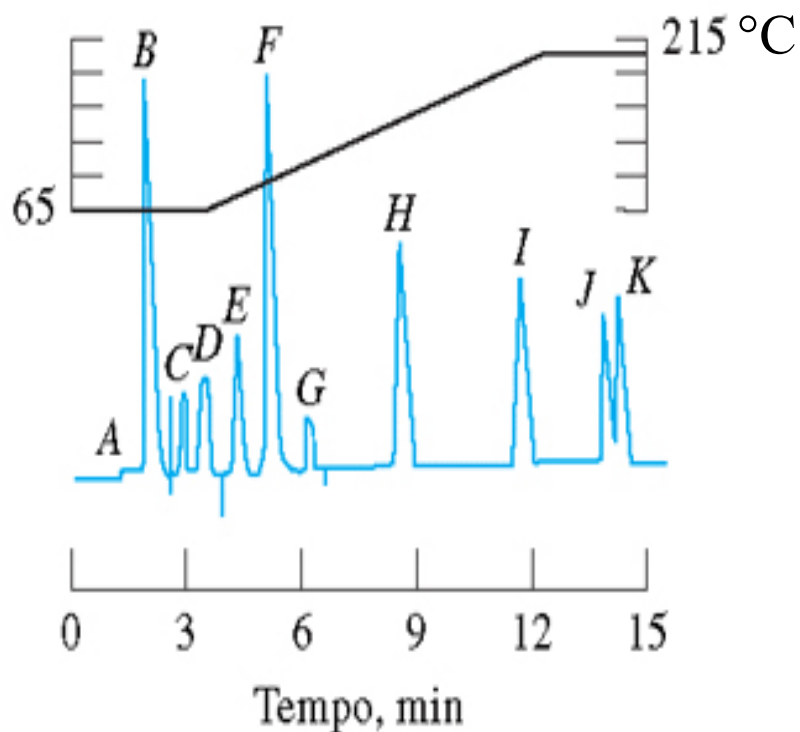
Sono polimeri derivanti dalla polimerizzazione di stirene e divinilbenzene:



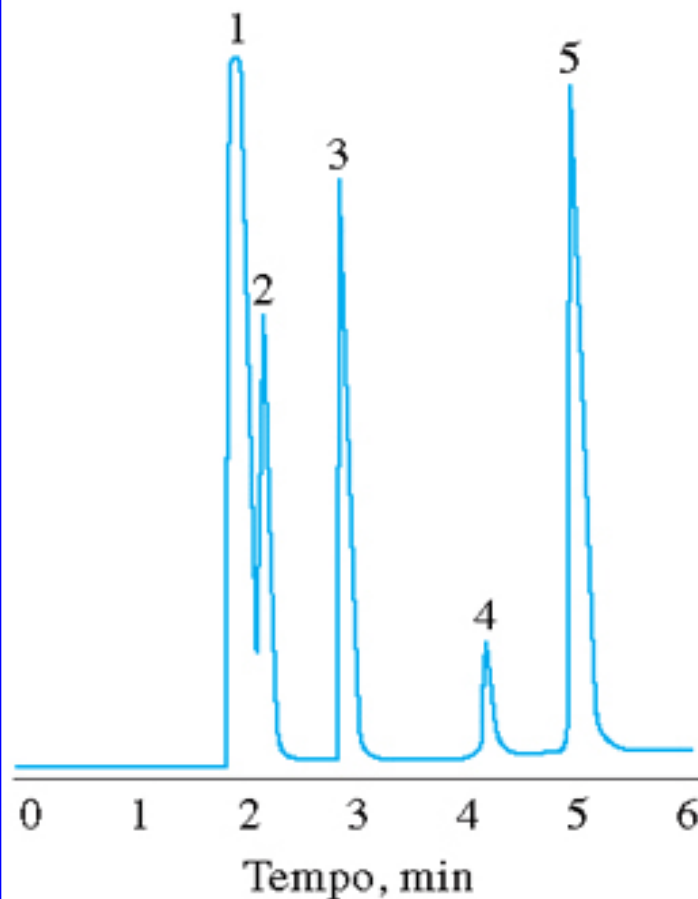
La loro struttura è reticolata per la presenza di unità di divinilbenzene, quindi anche in questo caso gli analiti sono ritenuti in base alle loro dimensioni. Tipicamente vengono impiegati nella separazione di **sostanze polari (acqua, ammoniaca, ammine, alcoli)**.

## Esempi di separazioni cromatografiche gas-solido

Miscela esausta: A, 35%  $H_2$ ; B, 25%  $CO_2$ ;  
C, 1%  $O_2$ ; D, 1%  $N_2$ ; E, 1%  $C_2$ ; F, 30%  $CH_4$ ;  
G, 3%  $CO$ ; H, 1%  $C_3$ ; I, 1%  $C_4$ ; J, 1%  $i-C_5$ ;  
K, 1%  $n-C_5$ .



1, aria; 2, metano; 3, biossido di carbonio; 4, etilene; 5, etano.



## Cromatografia di ripartizione con fase liquida non legata (o gas-liquido, GLC)

### Caratteristiche fondamentali della fase stazionaria:

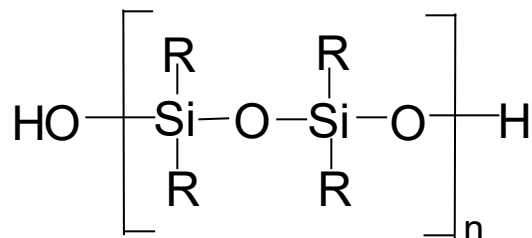
- Bassa tensione di vapore (il punto di ebollizione della fase stazionaria liquida dev'essere di almeno 100 °C superiore alla massima temperatura di operazione della colonna)
- Stabilità chimica
- Bassa viscosità

### Fasi stazionarie più comuni:

Polisilossani, polifenileteri, poliesteri, polietilenglicoli



## Polisilossani

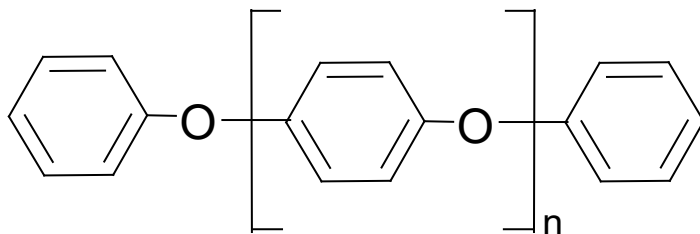


R = metile  
vinile  
fenile  
3,3,3-trifluoropropile  
cianoetile  
cianopropile



Nomi commerciali	R	Temperatura operativa massima (°C)	Applicazioni
OV-1	metile	350	CH <sub>x</sub> , IPA, PCB, steroidi
OV-3	metile/fenile 9:1	350	Esteri di acidi grassi, alcaloidi
OV-17	metile/fenile 1:1	250	Pesticidi, glicoli
OV-210	trifluoropropile/metile	200	Cloro e nitroderivati del benzene
OV-275	metile/cianopropile 1:1	250	Acidi grassi poliinsaturi alcoli

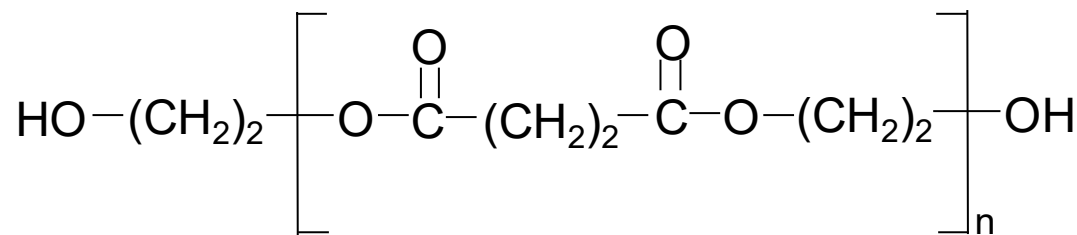
## Polifeniletero



$n = 3, 4$

E' stabile nell'intervallo di temperature 200-250 °C e ha una bassa viscosita' (grazie alla flessibilita' del legame dell'etere)

## Poliesteri



$n = 17-21$



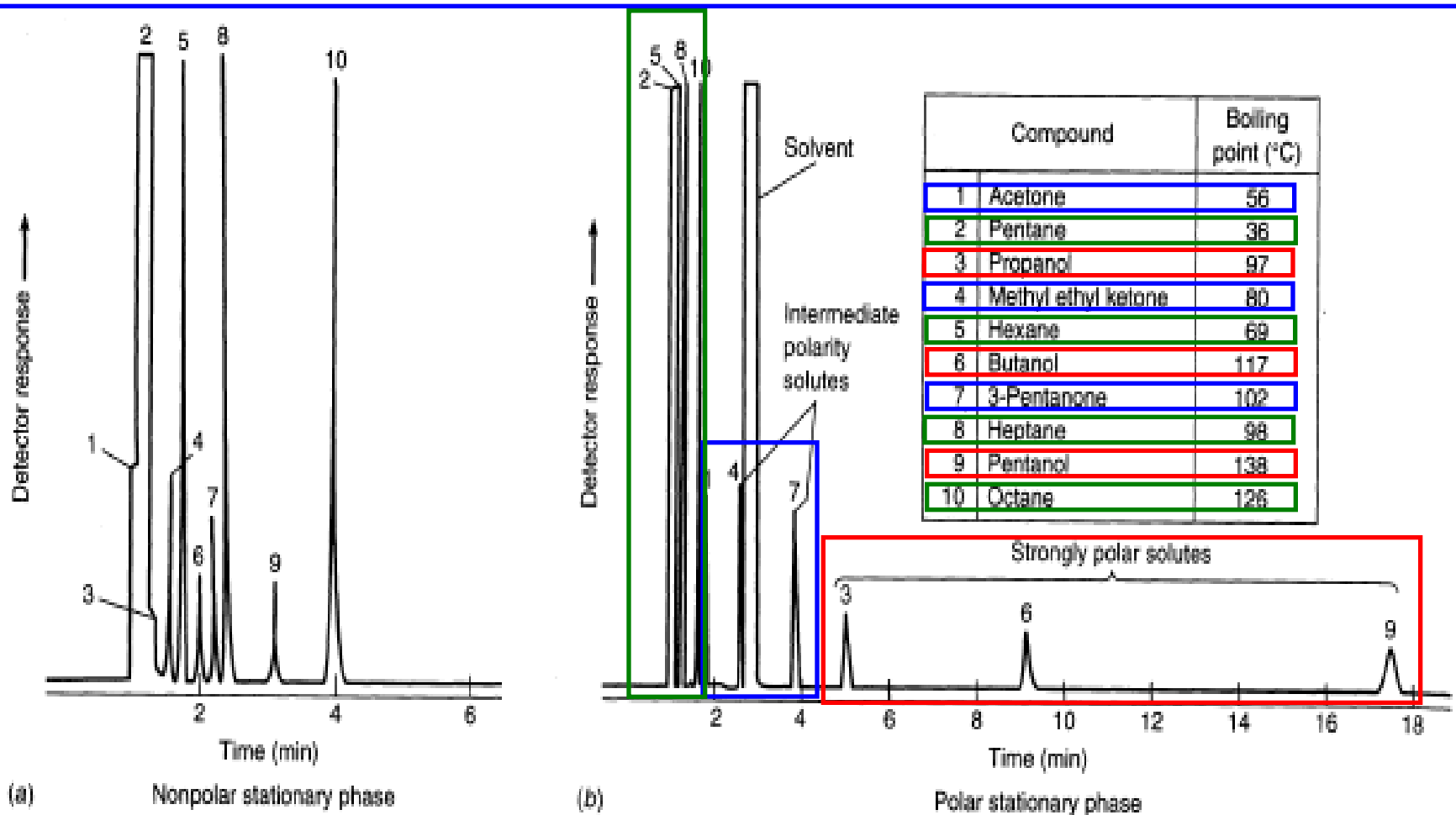
## Polietilenglicoli



Sono i composti più usati per la *GLC* con fase stazionaria polare.

Un esempio tipico di questa fase stazionaria e' il Carbowax 20M, che ha una temperatura operativa limite di 225 °C.

## Confronto fra separazioni GLC su due fasi stazionarie diverse



## Gas cromatografia con fase stazionaria legata (BPC)

Fa uso di fasi stazionarie **legate covalentemente** alla superficie del supporto di silice della colonna gas-cromatografica

### Vantaggi rispetto alle fasi non legate

- 👍 Maggiore stabilità termica
- 👍 Elevata efficienza cromatografica
- 👍 Riduzione della perdita di fase stazionaria dalla colonna durante le corse cromatografiche ("bleeding")

### Possibili procedure di preparazione

- ❖ Condensazione dei gruppi OH terminali di un silossano o di un glicole con i gruppi silanolici superficiali della silice di supporto:  
$$-\text{SiOH} + \text{ROH} \rightarrow -\text{Si-O-R}$$
- ❖ Reazione di **clorosilani mono o bifunzionali** con la silice

## Possibili meccanismi di interazione fra analiti e fasi legate

Dipendono dalla natura chimica della fase stazionaria

- ☞ **Catene alchiliche corte ( $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ):** prevale l'adsorbimento o sul supporto o sui gruppi funzionali della fase stazionaria legata
- ☞ **Gruppi polari ( $\text{CF}_3\text{CH}_2$ , glicoli):** prevale l'adsorbimento sulla fase legata
- ☞ **Catene alchiliche lunghe ( $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{16}\text{CH}_3$ ):** prevale la ripartizione, perche' la fase legata ha in questo caso un comportamento piu' simile a quello di un liquido