

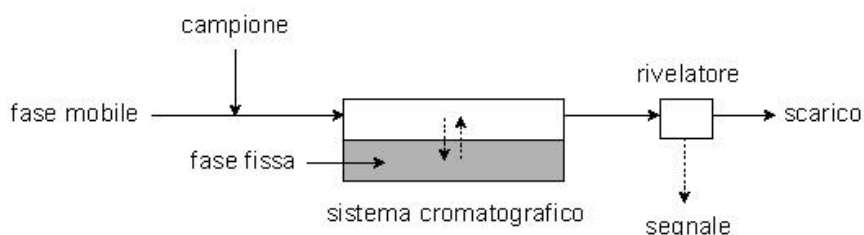
METODI CROMATOGRAFICI

1. Considerazioni generali

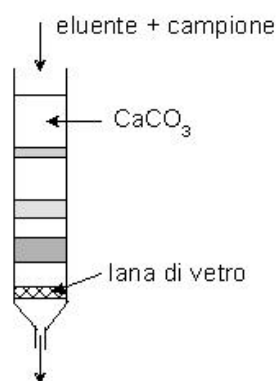
I metodi cromatografici costituiscono un insieme molto vasto di tecniche analitiche. Si tratta di **metodi chimico-fisici di separazione di miscele**, anche complesse (decine di componenti), basati sulla diversa affinità di ogni sostanza con due fasi diverse, una **fase fissa** ed una **fase mobile**, con cui la miscela viene messa a contatto.

Introducendo il campione nella fase mobile, quest'ultima lo trasporterà all'interno del sistema cromatografico. Facendo scorrere la fase mobile sulla fase fissa (o stazionaria) si stabiliscono una serie di equilibri competitivi tra la fase fissa e le sostanze che compongono la miscela presenti nella fase mobile, basati sulla **diversa affinità** delle sostanze del campione per le due fasi: le sostanze più affini per la fase mobile vengono trascinate maggiormente da quest'ultima e quindi usciranno per prime dal sistema cromatografico, mentre quelle più affini per la fase fissa, usciranno successivamente. I componenti del campione entrano tutti insieme nel sistema cromatografico ma escono uno alla volta, per effetto della **competizione tra fase fissa e fase mobile**.

Disponendo di un adatto sistema di rivelazione, si può individuare l'uscita di ogni sostanza (analisi qualitativa) ed anche valutarne la concentrazione nella miscela iniziale (analisi quantitativa): il rivelatore infatti produrrà un segnale in corrispondenza dell'uscita di ogni componente.

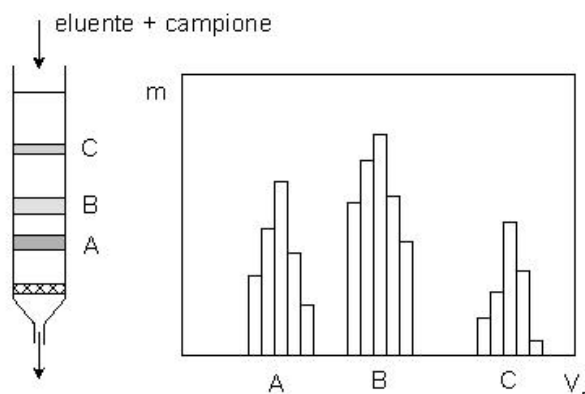


La cromatografia fu introdotta dalle esperienze del botanico russo M.S. Tswett che nel 1906 riuscì a separare i diversi pigmenti colorati che formavano la clorofilla.



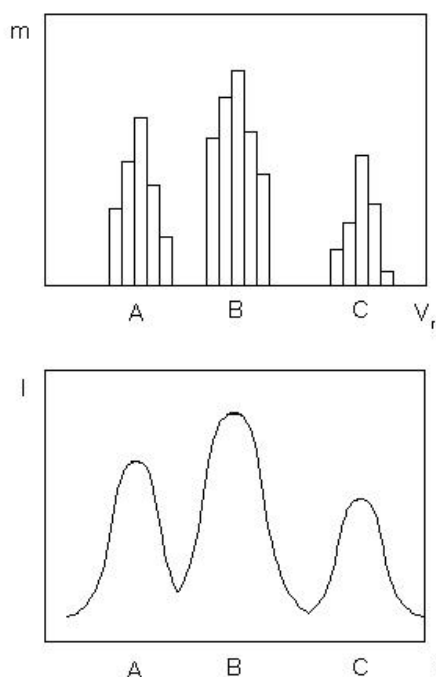
Su di una colonna riempita con CaCO_3 egli fece passare una soluzione di clorofilla in etere di petrolio; successivamente, continuando a versare dell'etere di petrolio (eluente), notò che si formavano lungo la colonna vari anelli diversamente colorati, che uscivano dal fondo in tempi successivi; concluse quindi che i diversi pigmenti colorati, che formavano inizialmente la clorofilla, venivano trattenuti con diversa forza sul CaCO_3 (fase stazionaria) e quindi venivano trasportati con diversa velocità dall'etere di petrolio (fase mobile). Attribui questo comportamento alla diversa affinità di ogni singolo pigmento alle due fasi: la sostanza più affine alla fase stazionaria viene trattenuta più a lungo e quindi esce successivamente. Era nata la cromatografia su colonna, ancora oggi utilizzata, anche se in seguito si sono sviluppate molte altre tecniche cromatografiche, che vengono utilizzate sia a scopo analitico, sia semplicemente a scopo preparativo, cioè di separazione di miscele complesse, analizzate successivamente con altre tecniche.

Questa esperienza è alla base di tutte le tecniche cromatografiche. Si consideri infatti il seguente esperimento fondamentale: si prepara una colonna riempita di fase stazionaria e si deposita sulla sua parte superiore una miscela analitica, composta ad esempio da tre sostanze (A, B e C).



m: massa di sostanza eluita
 V_r : volume di ritenzione

Dopo il caricamento del campione nella colonna, si versano successive quantità di eluente, cioè di una sostanza in grado di trascinare le sostanze presenti nel campione verso il basso; poiché queste vengono tratteneute con diversa forza sulla fase stazionaria, lungo il percorso si separeranno. Supponendo che siano colorate, si vedranno comparire 3 bande di diverso colore (se non fossero colorate si dovrebbe disporre di un adatto dispositivo indicatore all'uscita della colonna). Si raccolgono ora all'uscita le diverse frazioni di eluente, in recipienti diversi (ad esempio in piccole beute), mantenendo costante la frazione raccolta (ad esempio 10 ml). Al termine della separazione, in ogni recipiente vi saranno frazioni diverse delle 3 sostanze; si può quindi costruire un istogramma riportando il volume totale di eluente usato, detto volume di ritenzione V_r (volume di eluente necessario per trascinare all'uscita in modo completo ogni singolo componente della miscela), suddiviso in intervalli di 10 ml nel caso considerato, in funzione della massa di sostanza eluita. Si ottiene l'istogramma riportato sopra, da cui si vede come è avvenuta la separazione delle 3 sostanze contenute nel campione.



Se si immagina ora di ridurre sempre di più i volumi di eluente raccolti per ogni frazione (fino ad un valore infinitesimo) e contemporaneamente aumentare sempre di più il numero di frazioni raccolte (fino ad un valore infinito): si passerà da un istogramma ad un grafico continuo.

Questo esperimento può essere esteso concettualmente a qualunque separazione cromatografica: infatti se si dispone di un adatto rivelatore all'uscita del sistema cromatografico, che produca un segnale al passaggio di ogni sostanza componente la miscela analitica, si può riportare in un diagramma l'intensità del segnale I prodotto in funzione del tempo di uscita t di ogni componente.

Viene prodotto un diagramma, detto **chromatogramma**, in cui l'uscita di ogni componente della miscela viene segnalato dalla comparsa di un picco simile ad una gaussiana, di forma ed altezza diversi per ogni sostanza. L'analisi del chromatogramma permetterà di effettuare l'**analisi qualitativa e quantitativa** della miscela:

- il tempo di uscita di ogni sostanza sarà il parametro qualitativo
- l'area del picco di ogni sostanza sarà il parametro quantitativo

2. Meccanismi della separazione cromatografica

Nel processo cromatografico, la separazione delle sostanze che compongono la miscela analitica avviene per effetto della diversa "affinità" verso le due fasi, quella mobile e quella stazionaria, che costituiscono il sistema cromatografico. Durante l'eluizione, si ha una continua competizione tra le due fasi ed ogni sostanza è coinvolta in un processo dinamico di trasferimento tra le due fasi, mediante un processo di estrazione-trascinamento, che alla fine provoca una migrazione con diversa velocità di ogni componente e, di conseguenza, l'uscita in tempi diversi dal sistema.

Le interazioni tra analita e fasi cromatografiche sono di solito **interazioni deboli** (dipolo-dipolo, forze di van der Waals, ecc.) ma si possono anche formare legami di coordinazione, interazioni steriche, ecc.; in genere si ha un meccanismo principale di separazione, accompagnato da altri meccanismi secondari, che agiscono in misura minore.

Le diverse tecniche cromatografiche vengono distinte a seconda del meccanismo principale:

Adsorbimento: la fase stazionaria è un solido inerte, in polvere o in granuli, sulla cui superficie si trovano dei siti attivi, in grado di adsorbire con legami deboli (legami a H, dipolo-dipolo, forze di van der Waals, ecc.) le molecole della miscela da separare.

In tal caso si ha la cromatografia di adsorbimento: se la fase mobile è un gas si ha la cromatografia gas-solido (GSC - Gas Solid Chromatography), se è un liquido si ha la cromatografia liquido-solido (LSC - Liquid Solid Chromatography).

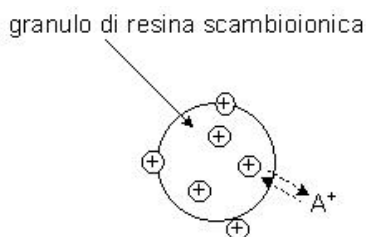
Durante l'eluizione, i componenti della miscela si ripartiscono dinamicamente tra le due fasi, mobile e stazionaria, a seconda dell'entità dell'adsorbimento.



A - analita presente nella miscela analizzata

Ripartizione: la fase stazionaria è un liquido che impregna un solido granulare inerte; deve essere immiscibile con la fase mobile. Durante l'eluizione i componenti della miscela si ripartiscono dinamicamente tra le due fasi a seconda della solubilità relativa. Questo meccanismo viene sfruttato nella cromatografia gas-liquido (GLC - Gas Liquid Chromatography) e nella cromatografia liquido-liquido (LLC - Liquid Liquid Chromatography)

Scambio ionico: la fase stazionaria è una resina a scambio ionico i cui controioni possono essere scambiati con ioni dello stesso segno trascinati dalla fase mobile; si instaura una competizione tra gli ioni della resina e quelli della fase mobile, che vengono separati in base alla diversa affinità con i siti ionici della fase stazionaria e si fissano sulla resina; facendo passare successivamente una soluzione concentrata del controione originale gli ioni fissati vengono eluiti in ordine di affinità crescente. Questo meccanismo si applica alla cromatografia di scambio ionico (IEC - Ion Exchange Chromatography)



A⁺ - analita presente nella miscela analizzata

Esclusione: la fase stazionaria è un solido poroso o un gel a porosità controllata, a seconda della composizione chimica e del metodo di preparazione; le molecole dell'analita, trascinate dalla fase mobile, penetrano nei pori e vi rimangono più o meno a lungo a seconda delle loro dimensioni: quelle più grandi vengono escluse dai pori e quindi escono prima dal sistema cromatografico. Su questo meccanismo si basa la cromatografia di esclusione (SEC - Solid Exclusion Chromatography).



A - analita presente nella miscela analizzata

L'analita A ha dimensioni compatibili con i pori della fase fissa e quindi viene scambiato con tale fase mentre l'analita B, troppo grande, viene escluso. Quindi A ha maggiore affinità per la fase fissa e pertanto uscirà dal sistema cromatografico dopo B

3. Tecniche cromatografiche

Esistono numerose tecniche cromatografiche, che si differenziano a seconda della fase mobile impiegata e del meccanismo principale di separazione. Le principali tecniche cromatografiche sono riportate nella tabella seguente:

Fase mobile	Strumentazione	Separazione	Tecnica
Liquido	Colonna	Ripartizione	Cromatografia l-l (LLC)
		Adsorbimento	Cromatografia l-s (LSC)
		Scambio ionico	Cromatografia a scambio ionico (IEC)
		Esclusione	Cromatografia di esclusione (SEC)
	Strato sottile (o carta)	Ripart. e adsorb.	Cromatografia su strato sottile (TLC)
		Scambio ionico	Cromatografia su s.s. a s.i. (TLIBC)
	Cromatografo l-l	Ripartizione	HPLC
Gas	Gascromatografo	Ripartizione	Cromatografia l-g (GLC)
		Adsorbimento	Cromatografia l-s (GSC)

LLC - Liquid Liquid Chromatography

IEC - Ionic Exchange Chromatography

TLC - Thin Layer Chromatography

HPLC - High Performance Liquid Chromatography

GSC - Gas Solid Chromatography

LSC - Solid Liquid Chromatography

SEC - Solid Exclusion Chromatography

TLIBC - Thin Layer Ion Exchange Chromatography

GLC - Gas Liquid Chromatography

4. Cromatografia su strato sottile (TLC)

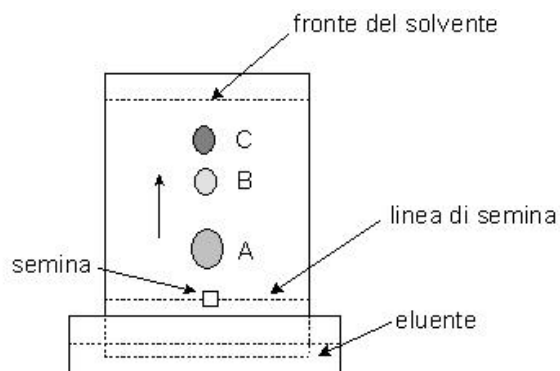
4.1. Principi ed applicazioni

E' una tecnica cromatografica in cui la fase fissa è immobilizzata, sotto forma di strato sottile, su di una superficie, generalmente piana, lungo la quale scorre per capillarità la fase mobile. Di solito la fase stazionaria è un materiale granulare omogeneo fatto aderire ad un supporto piano; l'insieme della fase stazionaria e del supporto viene detta **lastrina** (o placca). Questa tecnica ha oggi sostituito la cromatografia su carta (PC - Paper Chromatography), in cui la fase stazionaria era comune carta da filtro. La fase mobile, detta **eluente**, è un liquido puro o una miscela opportunamente scelta per l'analisi.

Si possono avere due casi:

- se la fase stazionaria è un materiale polare (per es. gel di silice) la separazione è dovuta a meccanismi di adsorbimento e l'eluente deve essere non polare; in tal caso si ha la cromatografia normale (o in fase diretta).
- se la fase stazionaria viene imbevuta con sostanze non polari, la separazione è dovuta a meccanismi di ripartizione e quindi l'eluente deve essere relativamente polare; in questo caso si ha la cromatografia in fase inversa.

La TLC è una tecnica piuttosto rapida perché consente di ottenere separazioni efficaci in poche decine di minuti; la tecnica più usata, è la cromatografia ascendente.



Il campione viene depositato sulla linea di semina e quindi la lastrina viene immersa in una vaschetta contenente l'eluente, che sale per capillarità e separa i componenti della miscela, a causa della diversa affinità per le due fasi, formando una serie di macchie che si vedono immediatamente, se possiedono un colore proprio, oppure vengono rivelate mediante opportuni reattivi chimici. Dal tipo di macchia e dalla sua disposizione sulla lastrina, si possono trarre informazioni qualitative e quantitative. Il processo di separazione della miscela è detto sviluppo. La TLC è adatta alla separazione di sostanze organiche o ioni inorganici e trova numerose applicazioni anche in campo biochimico, per le sostanze di origine naturale.

4.2. Parametri relativi alla TLC

Le prestazioni della TLC ed i suoi risultati analitici possono essere espressi attraverso una serie di **parametri caratteristici**:

1. **Selettività**: è la capacità del sistema di separare i componenti della miscela; dipende dalla diversa distanza percorsa dai componenti della miscela durante l'eluizione, e viene espressa dal **fattore di ritenzione** (R_F – Retention Factor) o di ritardo R_F , definito come:

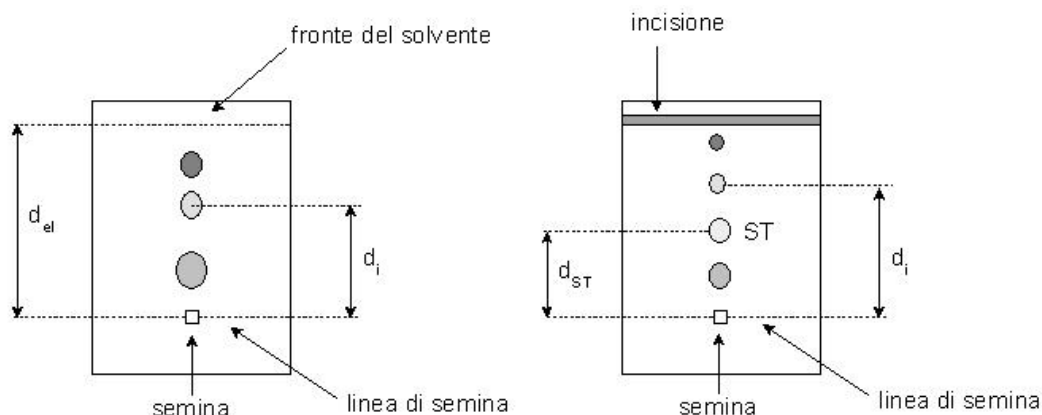
$$R_F = \frac{d_i}{d_{el}}$$

dove d_i è la distanza percorsa sulla lastra dall'i-esimo componente della miscela rispetto alla linea di semina e d_{el} è la distanza percorsa dall'eluente (fronte del solvente). Pertanto $R_F < 1$.

A volte si definisce un **fattore di ritenzione relativo** R_{rel} , facendo riferimento ad una sostanza della miscela scelta come standard di riferimento:

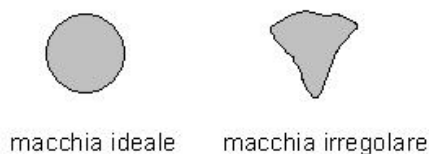
$$R_{rel} = \frac{d_i}{d_{ST}} = \frac{R_{Fi}}{R_{FST}}$$

dove d_{ST} è la distanza percorsa dallo standard, R_{Fi} è il fattore di ritenzione del componente i-esimo ed R_{FST} è il fattore di ritenzione dello standard. Il fattore di ritenzione relativo viene usato quando è necessario, per completare la separazione, spingere la corsa del solvente oltre il bordo superiore della lastrina e quindi non potrebbe più essere individuato più il fronte del solvente. A tale scopo la lastrina viene incisa vicino al bordo superiore e parte della fase solida viene asportata: in questo modo l'eluente arriva all'incisione e qui evapora, ma continua a trascinare le sostanze che ancora non hanno raggiunto l'incisione, permettendo la separazione di sostanze che hanno R_F molto simili. Con questa tecnica è come se la lastrina utilizzata avesse una lunghezza maggiore anche se, naturalmente, le sostanze che migrano maggiormente vanno perse all'interno dell'incisione. In questo caso R_{rel} potrà essere minore o maggiore di 1, a seconda della posizione sulla lastrina della sostanza scelta come standard.



Il fattore di ritenzione, per una data sostanza ed in generale per il sistema cromatografico, dipendono da vari fattori, tra cui: natura della fase stazionaria (composizione chimica, porosità, granulometria, ecc.), spessore dello strato, temperatura, composizione della fase mobile.

2. **Efficienza**: è la capacità del sistema a mantenere compatta la macchia fino al termine dell'eluizione; talora accade infatti che durante l'eluizione le macchie diffondano lateralmente, diventando larghe e con i bordi sfumati che rendono difficile la misurazione del R_F . Questo fenomeno dipende dall'omogeneità della fase stazionaria, che dovrebbe essere impaccata in modo uniforme e con particelle perfettamente sferiche.

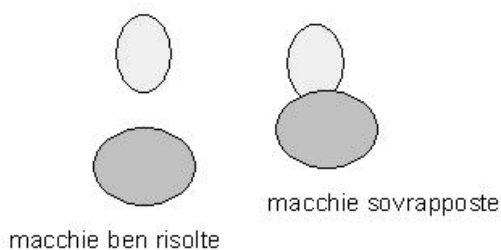


macchia ideale

macchia irregolare

Nel disegno a fianco sono confrontate due macchie cromatografiche: quella ideale ha una forma circolare, quella irregolare manifesta deformazioni dovute ad una scarsa efficienza del sistema cromatografico, che ha causato un trascinamento non omogeneo della sostanza da parte dell'eluente.

3. **Risoluzione**: è la capacità del sistema cromatografico di produrre macchie ben separate e quindi non sovrapposte, nemmeno parzialmente



Nel disegno a fianco sono confrontate due diverse situazioni: se le macchie sono ben risolte allora la separazione cromatografica è stata efficace; se al contrario sono sovrapposte non è possibile valutare i singoli R_F per cui occorrerà cambiare le condizioni operative: fase fissa, eluente, ecc.

4. **Capacità:** è la quantità massima di campione che può essere depositata sulla linea di partenza; di solito è sempre piuttosto piccola, dell'ordine dei μl . Infatti per ottenere una buona efficienza, non si deve superare la capacità, altrimenti non si ottengono macchie regolari ma con deformazioni di vario genere.
5. **Riproducibilità:** è la capacità di ottenere valori molti vicini di R_F per la stessa sostanza in prove successive; di solito è necessario effettuare la separazione cromatografica in condizioni standard e controllate.

4.3. Fase stazionaria

E' costituita dal materiale di supporto su cui è fissata la fase stazionaria vera e propria. I principali materiali di supporto sono:

- vetro, sotto forma di lastre di 1-2 mm di spessore; sono facili da maneggiare e rigide, ma sono anche fragili e pesanti; di solito sono 10 x 20 o 20 x 20 cm. Sono riutilizzabili eliminando la fase stazionaria già utilizzata e stratificandone, con un'apposita macchina, un'altra uguale o diversa. Oggi tendono ad essere sostituite con materiali meno fragili
- alluminio, venduti in lastre già pronte o in rotoli di circa 0,2 mm di spessore, da cui ritagliare lastre della forma desiderata; si deformano facilmente e non possono essere usate in ambienti molto alcalini o in presenza di acidi minerali
- plastica, in genere PET (polietilentereftalato), commercializzati in lastre o rotoli; alcuni solventi organici possono attaccare questi materiali plastici
- tessuto in microfibre di vetro: a differenza degli altri supporti, si ha la fase stazionaria che permea e ricopre interamente un intreccio di microfibre di vetro; in questo caso si hanno due superfici idonee all'eluizione.

La fase stazionaria può essere sia un solido che un liquido impregnante un supporto inerte. La fase stazionaria solida si comporta da adsorbente nei confronti dei costituenti della miscela sottoposta a cromatografia; l'efficienza dei diversi materiali adsorbenti viene espressa attraverso un parametro detto attività (forza con cui avviene l'adsorbimento). Si hanno diversi materiali.

- gel di silice SiO_2 : è il materiale più usato; è costituito da acido silicico H_4SiO_4 polimerizzato, amorfo ed altamente poroso, ottenuto per azione dell'acido solforico sul silicato sodico. La sua porosità e la presenza di gruppi polari -OH lo caratterizzano come un solido adsorbente ad elevata attività. Sono disponibili vari tipi di gel di silice, che si differenziano per porosità e granulometria e quindi per superficie adsorbente
- allumina Al_2O_3 : è costituita da miscele di ossidi di alluminio, preparati da idrossidi di Al naturali; anche l'allumina ha una elevata attività
- kieselguhr: è un prodotto di origine naturale, detto anche "farina fossile"; si tratta di acido silicico amorfo ottenuto macinando una roccia derivante dal deposito di alghe unicellulari (diatomee) in ambiente marino, che decomponendosi nella loro parte organica hanno lasciato come residuo, poi fossilizzato, il loro guscio siliceo. Ha attività media
- cellulosa microcristallina: si effettua in tal caso una cromatografia per ripartizione, con l'acqua trattenuta dalla cellulosa, in modo simile alla vecchia tecnica della cromatografia su carta. Si ottiene da cellulosa di origine naturale.

La fase stazionaria liquida permette di effettuare una cromatografia a fasi inverse. Si utilizza un liquido apolare o scarsamente polare depositato su lastre di cellulosa o gel di silice. Si impiegano a tale scopo idrocarburi, oli minerali, siliconi, oli e grassi vegetali, ecc. Poiché durante lo sviluppo del cromatogramma l'eluente tende a trascinare con sé una parte del liquido di ripartizione, sono state messe a punto speciali fasi legate, in cui il liquido è legato chimicamente al solido inerte di supporto.

4.4. Fase mobile

Deve essere scelta in base alla natura delle sostanze da separare; è fondamentale la sua **polarità**, perché da essa dipende la "forza" con cui una sostanza viene trascinata dall'eluente in una TLC normale. I solventi e le loro miscele sono stati ordinati in altrettante **serie eluotrope** (in realtà ve ne sono diverse versioni, dovute a diversi autori), in cui gli eluenti sono ordinati secondo la polarità crescente:

miscele di solventi
benzene/cloroformio (1+1)
cloroformio/acetone (95+5)
benzene/acetone (9+1)
.....
benzene/acetone (1+1)
cloroformio/metanolo (9+1)
diossano/acqua (9+1)

solventi puri
n-pentano
isottano
cicloesano
.....
metanolo
glicole etilenico
acido acetico

polarità crescente



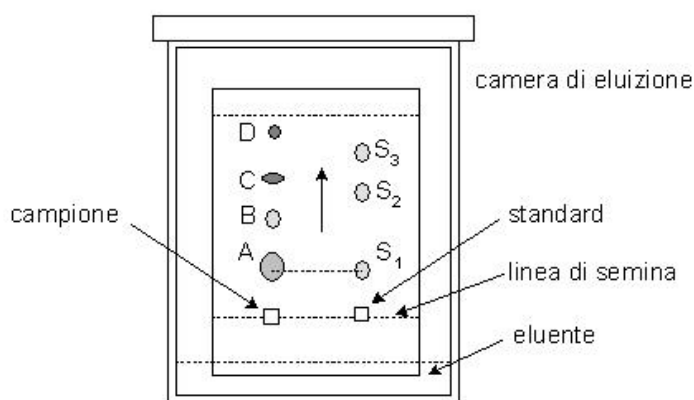
All'aumentare della polarità aumenta la capacità di eluire le molecole depositate sulla fase fissa. Ovviamente, per la buona riuscita di una TLC, occorre scegliere opportunamente la coppia fase fissa/fase mobile; vi sono diversi criteri di scelta:

- indipendentemente dalla natura delle sostanze da separare, la fase stazionaria e la fase mobile devono interferire tra loro il meno possibile: quindi dovranno avere una diversa polarità
- i componenti da separare devono interagire con entrambe le fasi, che devono quindi essere compatibili, anche se in modo diverso, con tutte le sostanze della miscela analitica
- il campione deve essere molto solubile nell'eluente, per mantenersi ben concentrato durante tutto lo sviluppo
- la TLC di adsorbimento è particolarmente adatta per separare tra loro classi diverse di composti come alcoli, aldeidi, idrocarburi, ecc., in ordine di polarità
- la TLC di ripartizione (in fase inversa) è più adatta per separare tra loro i componenti di una determinata classe (alcoli tra loro, idrocarburi tra loro, ecc.)

In ogni caso si possono effettuare delle prove fino a trovare le migliori condizioni di separazione.

4.5. Procedura di separazione

L'effettuazione di una TLC richiede una procedura standardizzata, che si articola nelle seguenti fasi.



1. **Predisposizione della camera cromatografica:** lo sviluppo delle lastre avviene in una camera cromatografica, una vasca a forma di parallelepipedo o cilindrica, chiusa, in cui si versa inizialmente l'eluente fino a formare uno strato di circa 1-2 cm sul fondo, aspettando il tempo necessario perché l'ambiente si saturi con i vapori di eluente
2. **Attivazione della lastra:** in alcuni casi (gel di silice) è necessario attivare la lastrina in stufa a circa 100°C per 1 ora per allontanare l'acqua adsorbita; si raffredda quindi in essiccatore
3. **Deposizione del campione:** è detta anche semina e si tratta di una fase particolarmente delicata; si segna con una matita (non con una biro, perché l'inchiostro subirebbe la cromatografia!) la linea di partenza e su di essa si depositano piccole quantità di campione, usando microsiringhe con capacità da 0,2 a 2 µl, formando una macchia di 2-3 mm di diametro; quindi si asciuga il solvente con un phon. Se la soluzione è molto diluita si possono fare più deposizioni successive alternate a fasi di asciugature col phon. A fianco al campione si possono seminare anche degli standard che consentono, al termine dello sviluppo, un confronto qualitativo immediato; naturalmente occorre avere già un'idea precisa sul tipo di sostanze presenti nel campione: ad esempio miscele di vitamine, di aminoacidi, di zuccheri, ecc.
4. **Eluizione:** si introduce la lastrina nella camera cromatografica, appoggiandola ad appositi sostegni inizialmente senza toccare l'eluente che si trova sul fondo: questa attesa (che dura da 10 a 60 minuti) serve a condizionare la lastra, permettendole di saturarsi coi vapori di eluente. Quindi, utilizzando la tecnica

ascendente, la più diffusa, si appoggia la lastrina al fondo della camera, chiudendo ermeticamente, accertandosi che la superficie dell'eluente rimanga al di sotto della linea di semina. L'eluente sale per capillarità sulla lastra e trasporta con diversa velocità i componenti della miscela, che vengono così separati. L'eluente viene fatto salire per 15-20 cm e quindi si arresta lo sviluppo, segnando con una matita il fronte del solvente, cioè l'altezza raggiunta. In qualche caso, si può incidere preventivamente con una spatola la lastra in corrispondenza del previsto fronte del solvente: quando l'eluente arriva nell'incisione evapora e non la oltrepassa

5. Essiccamento: si estrae la lastrina dalla camera cromatografica e si essicca all'aria o mediante un phon per allontanare l'eluente; se le sostanze non sono termodegradabili si può seccare in stufa per qualche minuto a 100-105°C
6. Rivelazione: consiste nell'evidenziare le singole macchie prodotte nello sviluppo. Vi sono vari metodi:
 - osservazione in luce UV: alcune sostanze (vitamine, ecc.) diventano fluorescenti se illuminate con luce UV; la lastra viene posta in un apposito dispositivo, detto lampada di Wood, che la illumina con luce UV, rendendo visibili le macchie, che possono essere evidenziate contornandole con una matita. Se le sostanze della miscela non sono fluorescenti, si può usare una lastra la cui fase stazionaria viene impregnata con una sostanza fluorescente: illuminando la lastra con radiazione UV si noteranno macchie scure su fondo fluorescente
 - nebulizzazione, con un apposito spruzzatore, di un reattivo cromatico, che reagendo con la sostanza della macchia, sviluppa una colorazione caratteristica; generalmente dopo la nebulizzazione si mette la lastra in stufa per fare avvenire la reazione di sviluppo del colore. Si tratta di reattivi specifici per i singoli casi che, tramite reazioni chimiche, sviluppano colorazioni particolari: I₂ in etanolo per sostanze azotate, AgNO₃ in NH₃ per sostanze riducenti, alizarina ed altri complessanti organici per ioni metallici, ninidrina per aminoacidi ed ammine, H₂S per cationi e metalli pesanti, reattivo di Fehling per gli zuccheri riducenti, ecc. Un reattivo generale per le sostanze organiche è l'H₂SO₄ concentrato, che a caldo le carbonizza, producendo macchie nere.

4.6. Analisi qualitativa

La TLC viene usata prevalentemente a scopo qualitativo; l'individuazione della sostanza potrebbe essere fatta calcolando graficamente l'**R_F assoluto o relativo** e confrontandolo con tabelle. Tale valore è piuttosto variabile anche per piccole fluttuazioni delle condizioni operative (temperatura, fase stazionaria e fase fissa, ecc.); per tale motivo questo dato non è sufficiente da solo. Spesso accanto al campione si seminano anche standard opportuni, che consentano di fare un confronto immediato; inoltre per confermare l'individuazione si effettuano varie prove variando le fasi cromatografiche.

Per esempio nel disegno precedente si vede subito che la sostanza A e lo standard S₁ sono la stessa specie chimica.

4.7. Analisi quantitativa

La determinazione quantitativa delle sostanze eluite non è agevole: è necessario che la procedura analitica sia rigorosamente standardizzata (quantità campione, temperatura, tempo di eluizione, ecc.).

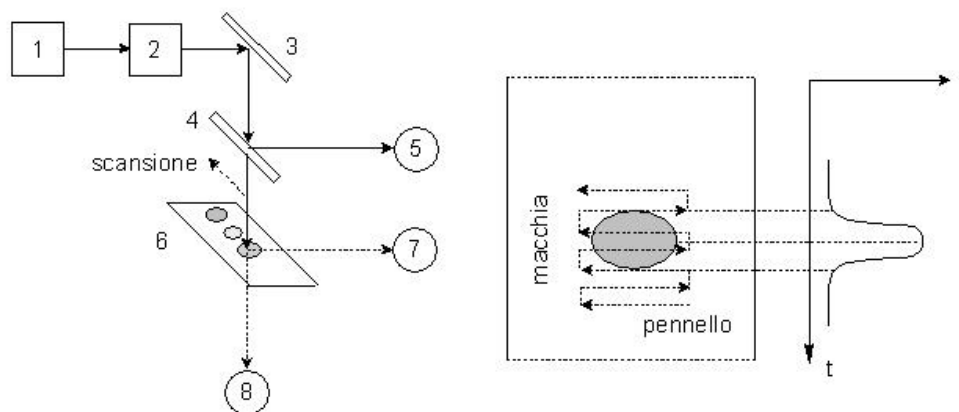
Al termine dello sviluppo e della rivelazione la determinazione quantitativa può essere fatta in vari modi:

Confronto dell'area della macchia: si confronta l'area della macchia con quelle di macchie ottenute da standard a concentrazione nota, seminati ed eluiti in parallelo al campione; si commette un errore non inferiore al 20-30% perché il risultato dipende da come è stata effettuata la semina

Asportazione della macchia: mediante una spatola si asporta la macchia insieme alla fase stazionaria, si estrae con un volume noto di un solvente opportuno e si procede con altri metodi di analisi (spettrofotometria, polarografia, ecc.). In questo caso la TLC viene utilizzata come metodo preliminare di separazione

Uso di fotodensimetri: sono apparecchi che illuminano le singole macchie con un pennello di luce lungo la direzione di eluizione oppure a zig-zag ed analizzano la quantità di luce trasmessa (se la lastrina è trasparente) o riflessa o emessa per fluorescenza, producendo un picco cromatografico vero e proprio; l'area di ogni picco è proporzionale alla concentrazione e quindi costruendo un'opportuna retta di taratura si risale alla concentrazione di ogni componente del campione.

Nel disegno seguente è illustrato lo schema di un fotodensimetro:



- 1: sorgente luminosa 2: monocromatore
 3: specchio 4: specchio semitrasparente
 5: rivelatore di riferimento 6: lastrina
 7: rivelatore (di riflettanza o di fluorescenza)
 8: rivelatore (di trasmittanza)

La sorgente luminosa è una lampada a D₂ (per misure tra 200 e 300 nm, quindi in UV), oppure una lampada alogena (per misure tra 340 e 700 nm, quindi nel VS) o infine una lampada a Hg (per misure di fluorescenza). La luce prodotta dalla sorgente viene monocromatizzata e quindi la λ selezionata mediante una fenditura viene trasformata in un sottile pennello di luce da uno specchio. La luce attraversa un secondo specchio semitrasparente, che ne invia una parte ad un rivelatore di riferimento (una fotocellula) mentre il resto va sulla lastrina. Un sistema automatico muove il pennello lungo la direzione di eluizione oppure a zig-zag su tutta la lastrina, in modo da esaminare tutte le macchie. Se la lastrina è trasparente si analizza la luce trasmessa mediante un rivelatore di trasmittanza (una fotocellula), se è opaca si analizza la luce riflessa o emessa mediante fluorescenza (altrettanti rivelatori a fotocellula).

Al termine della scansione della lastrina l'apparecchio, mediante confronto dei segnali tra il rivelatore di riferimento e quello di trasmittanza o di riflettanza/fluorescenza, trasforma i segnali emessi da ogni macchia in un vero e proprio cromatogramma a picchi, che può essere agevolmente interpretato per l'analisi qualitativa e quantitativa.

Rilevazione mediante PC: recentemente sono stati messi a punto dei sistemi relativamente economici, che utilizzano un comune scanner per acquisire l'immagine della lastrina cromatografica; l'immagine viene in seguito analizzata da uno specifico software che trasforma le macchie in picchi e produce il solito cromatogramma.

5. Gascromatografia (GC)

5.1. Principi ed applicazioni

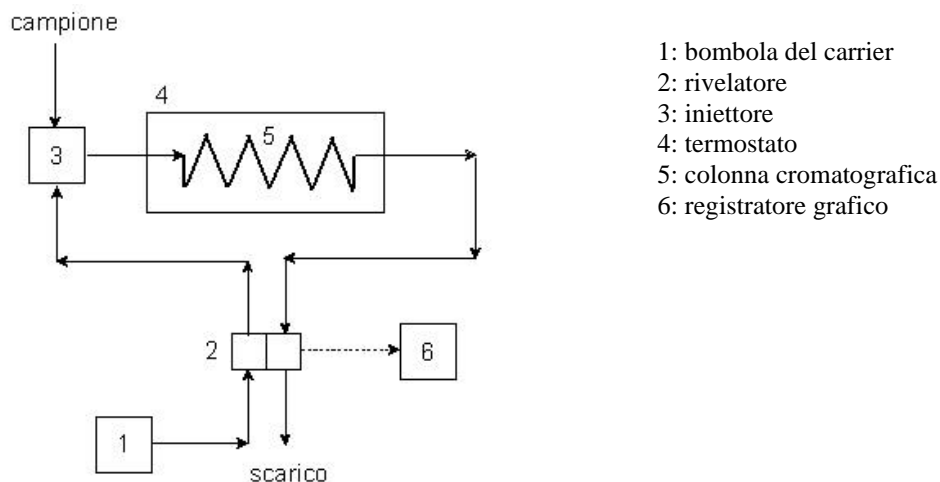
La gascromatografia (GC - Gas Chromatography) è una tecnica cromatografica in cui la fase mobile è un gas, detto **carrier** o gas di trasporto, che fluisce attraverso una colonna in cui si trova la fase stazionaria, in genere un solido su cui è immobilizzata un liquido di ripartizione, con una bassa tensione di vapore; in alternativa si ha una colonna vuota sulle cui pareti è depositato il liquido.

Il carrier trasporta lungo la colonna la miscela da separare, anch'essa vaporizzata, ed i suoi componenti vengono separati, presentandosi all'uscita in tempi diversi; un rivelatore ne segnala il passaggio producendo il cromatogramma, cioè il tipico diagramma a picchi, detto in questo caso **gascromatogramma**. I meccanismi di separazione sono diversi e dipendono dalla natura della fase stazionaria: il solido, se presente, è responsabile di equilibri di adsorbimento mentre il liquido è responsabile di equilibri di ripartizione. In ogni caso si stabilisce quella competizione tra fase fissa e mobile che è alla base della separazione della miscela analitica.

La GC nasce nel 1941 dalle idee di Martin e Synge e dai successivi sviluppi (1952) di James e Martin; conserva tutt'ora un posto di primo piano tra le tecniche analitiche in quanto consente l'analisi qualitativa e quantitativa di miscele anche molto complesse, di gas, liquidi o solidi purché siano vaporizzabili (i solidi prima dovranno essere solubilizzati). La vaporizzazione è il vero limite della GC, oggi superata dalla tecnica HPLC, che opera in fase liquida a temperatura ambiente, senza danneggiare sostanze termolabili. Le applicazioni sono numerosissime: controllo qualità, analisi dell'inquinamento, analisi di prodotti commerciali, ecc.

5.2. Schema del gascromatografo

Di seguito è riportato lo schema a blocchi di questo apparecchio, che consente di individuare i componenti essenziali:



Il gas di trasporto (carrier), viene erogato da una bombola a pressione opportuna; attraversa il rivelatore (di solito si tratta di rivelatori differenziali, che analizzano la differenza di una qualche proprietà tra il carrier puro e la miscela gassosa in uscita dalla colonna); quindi raccoglie il campione che viene vaporizzato mediante un apposito sistema di iniezione e lo trascina nella colonna cromatografica, situata in un sistema termostatico. Qui avviene la separazione tra i componenti gassosi, per effetto di ripetuti equilibri gas-solido e/o gas-liquido di adsorbimento e di ripartizione. I vari componenti si presentano uno alla volta all'uscita dove, attraversando il rivelatore differenziale, vengono rivelati se vi è differenza nella proprietà analizzata tra il carrier puro e la miscela analitica. Un sistema di elaborazione del segnale (amplificazione, ecc.) produce il segnale elettrico che comanda, nei vecchi modelli, il registratore grafico che traccia il gascromatogramma, in cui l'uscita di ogni componente della miscela è segnalata da un picco. Negli apparecchi moderni il segnale è acquisito in forma digitale. Dalla posizione e da altre caratteristiche dei picchi si può effettuare l'analisi qualitativa e quantitativa.

5.3. Colonne per gascromatografia

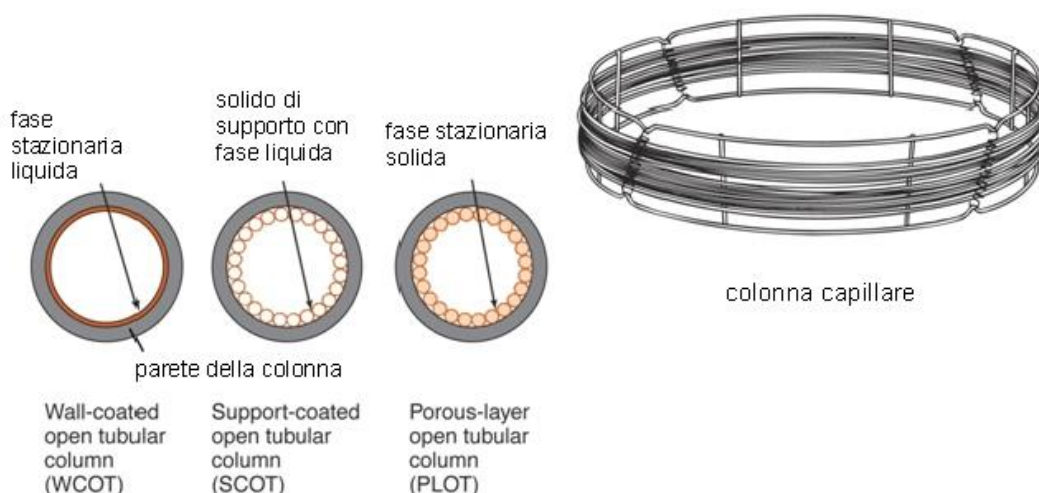
E' l'elemento fondamentale dell'apparecchio e contiene la fase stazionaria. Ve ne sono numerosi tipi: generalmente sono lunghe alcuni m e perciò sono ripiegate ad anello; sono intercambiabili all'interno del termostato in relazione alle caratteristiche della miscela da separare. Ve ne sono di due tipi:

1. Colonne impaccate (packed columns): hanno un diametro di 0,7-4 mm ed una lunghezza di 1-6 m; sono costituite da un tubo di acciaio, di vetro (per sostanze corrosive) o, più raramente, di rame (per sostanze poco reattive come gli idrocarburi). All'interno della colonna vi è il solido granulare, finemente macinato e fittamente impaccato, su cui viene depositato il liquido poco volatile di ripartizione. Il carrier percorre la colonna attraversando gli spazi liberi lasciati dalle particelle del riempimento. Sono le colonne meno costose ma anche le meno efficienti.
2. Colonne capillari (open tubular columns): sono oggi le più diffuse perché molto più efficienti, anche se più costose. Sono costituite da un sottile capillare di vetro, lungo 15-100 m con un diametro di 0,1-0,75 mm, vuoto all'interno, con un sottile film di liquido (0,1-5 μm) di ripartizione depositato sulla parete interna. Il carrier percorre il sottile canale centrale e questo agevola il flusso del gas, consentendo un miglior contatto tra le due fasi. A seconda del modo con cui è preparata la fase stazionaria si hanno vari tipi di colonne capillari:
 - a) colonne capillari aperte (Wall Coated Open Tubular - WCOT), in cui la parete interna è ricoperta o legata chimicamente con la fase stazionaria liquida
 - b) colonne capillari aperte con rivestimento supportato (Support Coated Open Tubular - SCOT) in cui un materiale granulare molto fine, su cui è depositato il liquido di ripartizione, viene fatto aderire alla parete interna
 - c) colonne capillari aperte con rivestimento poroso (Porous Layer Open Tubular - PLOT) in cui la fase stazionaria è costituita solo da particelle porose fatte aderire alla parete

In relazione al diametro della colonna, si ha una ulteriore classificazione delle colonne capillari in:

- narrow bore con diametro di 0,25 mm
- wide bore con diametro di 0,53 mm

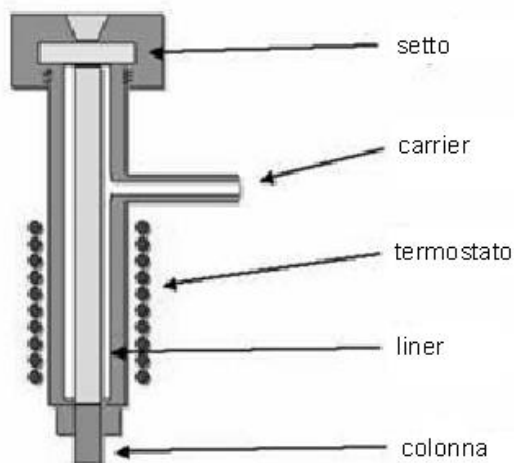
- mega bore con diametro di 0,75 mm



5.4. Iniettori

E' il dispositivo che consente l'introduzione in colonna del campione; sono riscaldati (di solito con lo stesso sistema termostatico della colonna) per consentire l'immediata vaporizzazione del campione e la sua miscelazione col carrier. Il campione viene introdotto mediante apposite microsiringhe, alcune delle quali permettono di misurare fino a 0,01 μl). Vi sono due tipi di iniettori:

1. Iniettori per colonne impaccate: in queste colonne si possono iniettare quantità relativamente grandi di campione; l'iniettore non richiede quindi particolari accorgimenti, come mostrato di seguito:



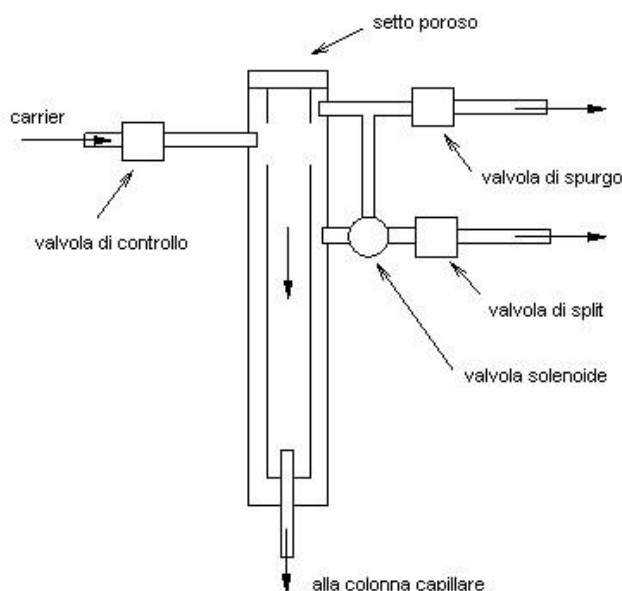
E' costituito da un tubo metallico, chiuso nella parte superiore da un diaframma di materiale plastico, detto setto poroso (di solito di teflon), in cui viene introdotto il campione mediante una microsiringa. L'intero corpo dell'iniettore viene termostattizzato alla stessa temperatura della colonna, per cui il campione liquido introdotto con la microsiringa vaporizza quasi istantaneamente e quindi viene mescolato col carrier all'interno di un sottile tubicino presente nell'iniettore, detto liner.

La miscela gassosa così prodotta passa infine nella parte superiore della colonna, dove subisce la separazione cromatografica.

2. Iniettori per colonne capillari: in queste colonne possono essere iniettate solo quantità minime di campione (dell'ordine dei nl), inferiori al volume della più piccola microsiringa disponibile; per evitare di introdurre una quantità eccessiva di campione, ogni iniettore ha dei dispositivi particolari, come ad esempio il sistema **split-splitless** mostrato nella seguente figura.

Quando il sistema viene usato in **modo split** (separazione ed eliminazione di una parte del campione) il flusso di carrier viene diviso in 2 parti: una è diretta verso il setto poroso per mantenerlo sempre pulito e quindi viene scaricata dalla valvola di spurgo; l'altra trascina il campione vaporizzato in parte in colonna ed in parte verso lo scarico all'esterno mediante la valvola di split.

In questo caso si ha lo svantaggio di una diminuzione di sensibilità, in quanto una parte del campione non entra in colonna.



Quando il sistema viene usato in **modo splitless** (eliminazione di una parte del carrier in modo da ridurre i volumi iniettati in colonna) la valvola di split è quasi sempre aperta e scarica all'esterno la maggior parte del carrier; all'atto dell'iniezione del campione la valvola di split viene chiusa e riaperta solo dopo qualche secondo. In questo modo l'intero campione entra in colonna che però è praticamente vuota, essendo attivo il modo split fino all'iniezione stessa.

La valvola solenoide permette di commutare il modo split in splitless e viceversa, aprendo e chiudendo la relativa valvola di split. Pertanto nel modo splitless il campione entra praticamente per intero in colonna e non si ha diminuzione della sensibilità.

5.5. Rivelatori

Sono i dispositivi che, all'uscita dei vari componenti la miscela analitica dalla colonna cromatografica, producono un segnale elettrico che viene trasformato in seguito nel gascromatogramma. I rivelatori devono essere insensibili al carrier e devono produrre un segnale specifico per ogni componente in uscita. Vi sono due categorie di rivelatori:

- **rivelatori universali**, che permettono di individuare tutti i componenti di una miscela con una sensibilità più o meno elevata; sono anche detti aspecifici;
- **rivelatori selettivi**, che consentono di individuare solo particolari categorie di composti.

I rivelatori più usati oggi sono di tipo differenziale: forniscono cioè una linea di base piatta quando dalla colonna esce solo il carrier mentre producono un picco in corrispondenza dell'uscita di un componente eluito.

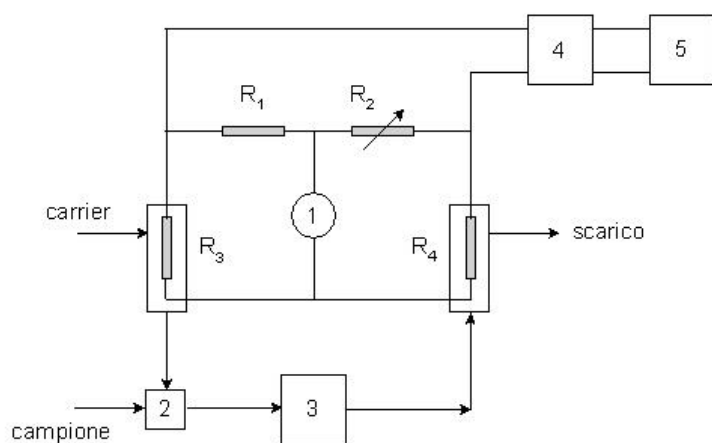
Le prestazioni di un rivelatore vengono caratterizzate mediante i seguenti parametri:

1. **Selettività**: è la capacità di rivelare tutte o in parte le sostanze separate.
2. **Sensibilità**: è l'intensità del segnale prodotto in corrispondenza di una determinata massa o concentrazione di sostanza rivelata; la sensibilità deve essere molto elevata e deve essere direttamente proporzionale alla massa o alla concentrazione della sostanza.
3. **Rumore di fondo (noise)**: è il segnale prodotto in corrispondenza dell'uscita del solo carrier; deve essere il più basso possibile ed è dovuto all'inevitabile piccolo spurgo della fase stazionaria liquida presente in colonna; dipende quindi dalla volatilità del liquido di ripartizione.
4. **Deriva**: è legata alla instabilità intrinseca del rivelatore; è rappresentata dallo spostamento della linea di base verso l'alto o verso il basso nel lungo periodo (30-60').
5. **Intervallo di linearità**: è l'intervallo di concentrazioni (o masse) all'interno del quale la sensibilità rimane costante.

Vi sono vari tipi di rivelatore, che saranno descritti di seguito.

5.5.1. Rivelatore termoconduttivo (HWD)

L'HWD (Hot Wire Detector) è un rivelatore universale basato sul ponte di Wheatstone, formato da 2 filamenti sottile di leghe speciali (Ni-W, Pt-W, ecc.) immersi nel flusso del carrier: uno è posto prima della colonna, l'altro è posto all'uscita:



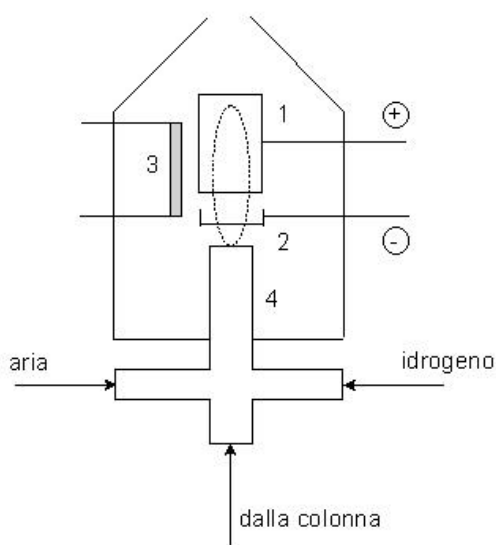
- 1: alimentatore in corrente continua
- 2: iniettore
- 3: colonna e sistema termostatico
- 4 amplificatore
- 5: registratore grafico

Il ponte è costituito da 4 rami, su cui sono presenti altrettante resistenze: uno di riferimento (R_1+R_3) e l'altro di misura (R_2+R_4); il ponte è equilibrato, cioè non si ha passaggio di corrente elettrica quando: $(R_1/R_3) = (R_2/R_4)$. Inizialmente passa solo il carrier: il ponte viene equilibrato mediante la resistenza variabile R_2 per produrre la linea di base del gascromatogramma. I valori di R_3 ed R_4 dipendono dalla temperatura del filamento, che a sua volta dipende dalla conducibilità termica del carrier (quando il suo flusso rimane costante); quando esce un componente dalla colonna cromatografica, la miscela di gas che lambisce R_4 ha una composizione diversa dal solo carrier e quindi varia la sua conducibilità termica e di conseguenza il valore di R_4 . Ciò provoca uno sbilanciamento del ponte e la corrente elettrica prodotta, opportunamente amplificata, costituisce il segnale ed azionerà il registratore grafico producendo il corrispondente picco.

Questo rivelatore è totalmente aspecifico e quindi è di impiego generale; richiede tuttavia l'uso, come carrier, di H_2 o He , che hanno una elevata conducibilità termica, nettamente diversa da quella di quasi tutte le altre sostanze chimiche, in modo da garantire una buona sensibilità al rivelatore. E' inoltre richiesta una termostattizzazione molto accurata del rivelatore, di solito separata da quella della colonna. Il limite di rivelabilità dell'HWD è modesto e difficilmente scende aldisotto della p.p.m., mentre la linearità della risposta è abbastanza buona; i tempi di risposta sono medio lunghi ma si tratta di un rivelatore robusto e preciso se ben tarato; il consumo di carrier è piuttosto rilevante ma la necessità di manutenzione è ridotta.

5.5.2. Rivelatore a ionizzazione di fiamma (FID)

Nel FID (Flame Ionisation Detector) i gas in uscita dalla colonna vengono miscelati con aria e H_2 e quindi sottoposti a combustione in un microbruciatore di quarzo, in cui sono immersi due elettrodi; nella combustione si producono ioni che trasferendosi sugli elettrodi producono un segnale elettrico, in grado di azionare il registratore grafico:



- 1: elettrodo collettore (anodo)
- 2: catodo
- 3: filamento di ignizione
- 4: ugello di quarzo

Tra i due elettrodi viene applicata una d.d.p. di circa 300 V, quindi si alimenta il bruciatore con i due gas e, mediante un filamento di ignizione, si accende la fiamma. Quando passa solo il carrier (in genere N_2), si registra solo una debole corrente di fondo; quando esce un componente eluito (di solito di natura organica), viene immediatamente bruciato all'interno della fiamma e gli ioni prodotti nella combustione producono un netto aumento della corrente circolante tra i due elettrodi; la variazione viene trasmessa al sistema di registrazione che traccia il gascromatogramma. Le prestazioni del FID dipendono soprattutto dal rendimento del processo di ionizzazione e dal flusso dei gas combustibile e comburente.

Il FID è un rivelatore di tipo distruttivo, poco selettivo, quasi universale: vi sono poche sostanze che non vengono rivelate, e tra queste l'acqua; il FID è quindi adatto all'analisi di soluzioni acquose e, nel caso di gas, non risente della presenza di umidità. E' un rivelatore molto sensibile (ha un limite di rivelabilità intorno a 10^{-9} - 10^{-12} g) con un elevato campo di risposta lineare; è molto robusto e può sopportare un esercizio continuo per tempi lunghi, garantendo prestazioni soddisfacenti.

5.5.3. Rivelatore a cattura di elettroni (ECD)

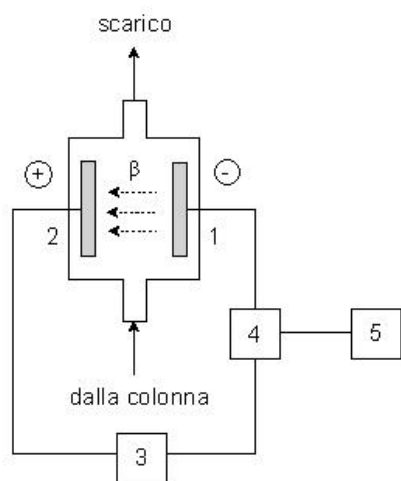
L'ECD (Electron Capture Detector) è un rivelatore selettivo, non distruttivo, con una sensibilità maggiore del FID. E' specifico per gli analiti con elevata affinità elettronica (alogenoderivati, ecc.). Contiene al suo interno una sorgente radioattiva di particelle β (elettroni veloci).

La debole sorgente radioattiva di raggi β può essere costituita da:

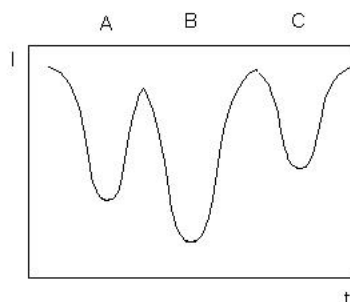
- una lamina di acciaio rivestita di trizio di titanio TiT_3 che può essere usata fino a $220^\circ C$
- una lamina di oro rivestita di ^{63}Ni che può essere usata fino a $350^\circ C$

La sorgente radioattiva costituisce il catodo di una coppia di elettrodi: gli elettroni emessi ionizzano il carrier (di solito N_2): $N_2 + \beta \rightarrow N_2^+ + e^-$

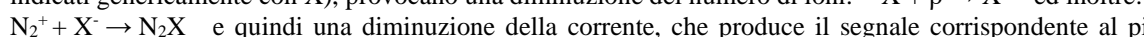
Gli ioni prodotti chiudono il circuito, producendo una linea di base caratterizzata da un'elevata corrente di fondo; in questo caso la linea di base del cromatogramma si troverà in alto nel grafico.



- 1: catodo radioattivo (emettitore di particelle β)
- 2: anodo
- 3: alimentatore in corrente continua
- 4: amplificatore
- 5: registratore grafico



Quando escono dalla colonna dei componenti eluiti con elevata elettroaffinità (per esempio alogenuri alchilici indicati genericamente con X), provocano una diminuzione del numero di ioni: $X + \beta \rightarrow X^-$ ed inoltre:

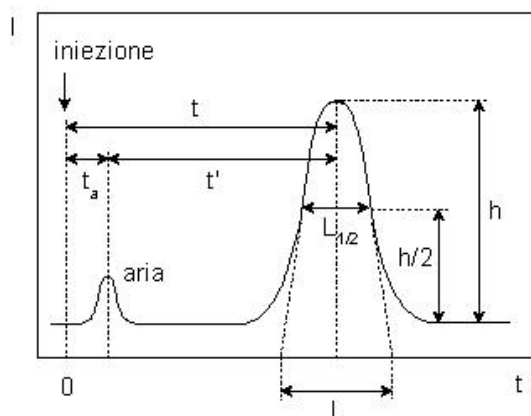


e quindi una diminuzione della corrente, che produce il segnale corrispondente al picco. Il gascromatogramma, in questo caso, risulta capovolto, con la linea di base in alto ed i vertici dei picchi in basso.

E' un rivelatore non distruttivo altamente specifico e selettivo (per gli alogenoderivati ed i composti metallo-organici); non è sensibile alla maggior parte delle sostanze organiche; ha una linearità limitata, che dipende anche dalla temperatura di funzionamento.

5.6 - Il gascromatogramma

Il segnale prodotto in una separazione cromatografica dal rivelatore viene opportunamente elaborato e quindi inviato ad un registratore grafico oppure ad un sistema computerizzato, che traccia il gascromatogramma, caratterizzato da un insieme caratteristico di picchi. Ogni picco, che idealmente dovrebbe essere una gaussiana, è caratterizzabile mediante una serie di parametri:



- altezza: è la distanza h dalla linea di base
- larghezza: è la distanza L individuata sulla linea di base dalle due tangenti alla curva nei punti di flesso; è una grandezza poco usata perché raramente il picco è perfettamente simmetrico; quindi di solito si fa riferimento a $L/2$, misurata ad $h/2$
- tempo di ritenzione: tempo t che intercorre tra l'iniezione ($t = 0$) e la comparsa del massimo del picco di eluizione
- volume di ritenzione: è il volume V (ml) della fase mobile impegnata per il trasporto del componente dall'iniettore fino al rivelatore; se Q è la portata del carrier (ml/min) e t è il tempo (min) allora : $Q = V/t$ e quindi: $V = Q \cdot t$
- tempo di ritenzione corretto: dopo l'iniezione si ha quasi subito un primo picco, dovuto all'eluizione dell'aria introdotta in colonna nell'iniezione del campione, che non viene trattenuta; spesso si preferisce fare riferimento al tempo di ritenzione corretto t' , misurato a partire dall'uscita della prima sostanza non trattenuta perché risulta più significativo; indicando con t_a il tempo morto, corrispondente all'eluizione dell'aria si ha: $t' = t - t_a$
- volume di ritenzione corretto: è dato da $V' = Q \cdot t'$, ovvero $V' = V - V_a$ essendo $V_a = Q \cdot t_a$ cioè il volume di ritenzione della sostanza non trattenuta

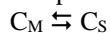
Negli apparecchi recenti il picco corrispondente all'uscita dell'aria viene automaticamente eliminato e quindi i tempi di ritenzione misurati dall'apparecchio sono già quelli corretti.

5.7 Parametri fondamentali della cromatografia

I seguenti parametri operativi descrivono qualsiasi separazione cromatografica, sia GC che LC.

5.7.1. Costante di distribuzione

Durante il loro cammino nella colonna, trascinati dalla fase mobile, i componenti del campione, per effetto della competizione si ripartiscono dinamicamente tra la fase fissa e fase stazionaria:



C_M : concentrazione di una sostanza nella fase mobile

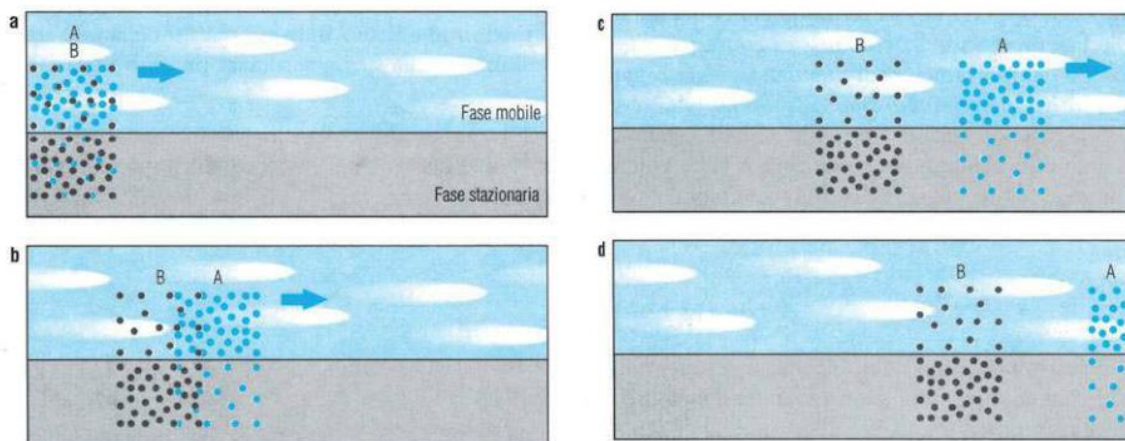
C_S : concentrazione della stessa sostanza nella fase stazionaria

All'equilibrio si può scrivere la **costante di distribuzione** che rappresenta la distribuzione nella 2 fasi:

$$K_C = \frac{C_S}{C_M}$$

Si ha che il rapporto delle due concentrazioni rimane costante e il suo valore dipende dalla diversa affinità della sostanza per le 2 fasi a contatto. Tale costante dipende solo dalla natura della fase mobile e stazionaria e dalla temperatura; costituisce pertanto una grandezza termodinamica.

Se K_C è grande la sostanza è più affine per la fase stazionaria e quindi rimarrà meno a lungo nella fase mobile. Ne consegue che i tempi di ritenzione e i volumi di ritenzione dipenderanno da K_C , come rappresentato nella figura seguente:



Avendo 2 diverse sostanze A e B, con $K_{CB} > K_{CA}$, per effetto del trascinamento della fase mobile le due sostanze si separeranno formando 2 bande distinte. Da notare che B, più affine per la fase stazionaria, assume una concentrazione maggiore in questa fase, mentre per A è il contrario.

Ricordando che:

- volume di ritenzione V_R : volume di fase mobile corrispondente all'uscita del massimo del picco cromatografico
- volume della fase mobile V_M (detto anche volume morto): volume della colonna non occupato dalla fase stazionaria e quindi a disposizione della fase mobile
- volume di ritenzione corretto per un dato componente V_X : volume di fase mobile "in più" rispetto a V_M per fare uscire il componente dalla colonna
- volume della fase stazionaria presente in colonna V_S

si può scrivere:

$$V_R = V_M + V_X$$

Se una sostanza non viene trattenuta in colonna, cioè ha una affinità nulla per la fase stazionaria, allora $K_C = 0$ e quindi $V_X = 0$; inoltre V_X è correlato al volume di fase stazionaria V_S , perché, a prescindere dal valore di K_C , la quantità di fase stazionaria influisce sui volumi e sui tempi di ritenzione perché si modifica la quantità di scambi con la fase mobile.

Si può dimostrare che vale la seguente equazione:

$$V_R = V_M + K_C \cdot V_S$$

che costituisce l'equazione fondamentale della cromatografia, che permetterebbe il calcolo di K_C a partire dai volumi misurati sperimentalmente. Dato che V_S è difficile da valutare si preferisce usare il fattore di ritenzione.

5.7.2 Fattore di ritenzione

Il **fattore di ritenzione** o di capacità k è definito come:

$$k = \frac{n_S}{n_M}$$

n_S : moli di un componente nella fase stazionaria

n_M : moli dello stesso componente nella fase mobile

Si può dimostrare che vale la seguente equazione:

$$k = \frac{V_S}{V_M} \cdot K_C$$

Si evidenzia che k non dipende solo da fattori termodinamici (espressi da K_C) ma anche dal volume delle due fasi presenti in colonna e quindi k caratterizza il comportamento di una coppia di fasi in una determinata colonna con le sue caratteristiche geometriche. Il fattore k è caratteristico di una sostanza in una determinata colonna.

Indicando con $\beta = V_S/V_M$ si ha:

$$k = \beta \cdot K_C$$

Due diverse colonne, con le stesse fasi stazionaria e mobile, operanti alla stessa temperatura possono avere un diverso valore di k per una certa sostanza, dato che possono avere una diversa geometria e un diverso metodo di preparazione e quindi un diverso valore di β .

Riarrangiando le equazioni precedenti si ottiene:

$$k = \frac{t'_R}{t_M}$$

t'_R : tempo di ritenzione corretto per una determinata sostanza

t_M : tempo morto, corrispondente all'uscita dalla colonna del componente non trattenuto dalla fase stazionaria (aria per la GC, eluente per la LC)

Dato che i due tempi sono facilmente determinabili sperimentalmente dal cromatogramma, è possibile il calcolo di k utilizzando la suddetta equazione.

Riassumendo si può dire che il fattore di ritenzione k :

- è sia un parametro termodinamico che cinetico
- esprime il tempo t'_R che ogni componente del campione passa nella fase stazionaria rispetto al tempo t_M che passa in colonna; infatti tutti i componenti passano lo stesso tempo in colonna, ovvero t_M
- esprime il grado di ritardo di un componente da parte della fase stazionaria e quindi rappresenta la distribuzione dinamica nel tempo del componente nelle due fasi, al contrario di K_C che esprime solo l'equilibrio termodinamico e non cinetico
- dipende dalla temperatura, dalla natura delle 2 fasi a contatto, ma anche dall'impaccamento, dalla granulometria e dallo spessore della fase stazionaria
- non dipende dalla lunghezza della colonna e dal flusso della fase mobile; permette quindi di confrontare le prestazioni di 2 colonne, a parità di fase mobile
- è necessario che il k della 1° sostanza eluita sia > 1 , per non mescolarsi con il componente non trattenuto in colonna. I vari componenti della miscela dovranno avere valori di k diversi per una corretta separazione ma non troppo elevati (al massimo 10-15) per non avere tempi di eluizione troppo elevati.

5.7.3 Selettività

E' la capacità di un sistema cromatografico di eluire sostanze diverse a velocità il più possibile diverse, in modo da produrre 2 picchi nettamente separati nel cromatogramma. La selettività viene espressa dal **fattore di separazione** o ritenzione relativa:

$$\alpha = \frac{t'_{RB}}{t'_{RA}}$$

dove i t' sono i tempi di ritenzione corretti riferiti a 2 sostanze diverse, A e B, che danno due picchi adiacenti nel cromatogramma.

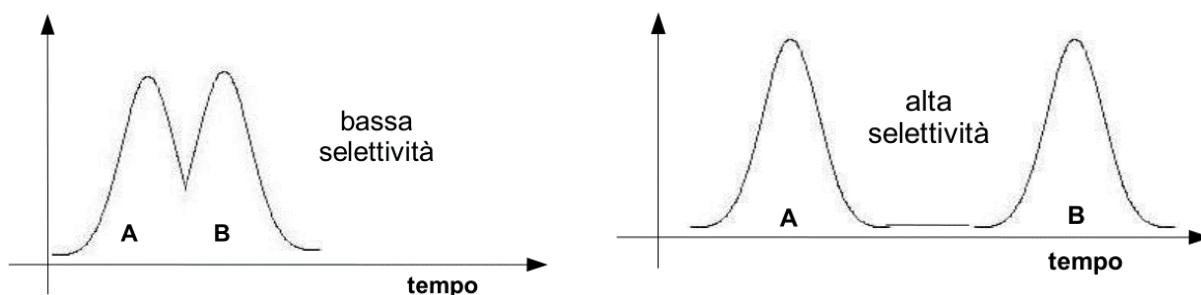
Si dimostra che vale la relazione:

$$\alpha = \frac{k_B}{k_A} = \frac{K_{CB}}{K_{CA}}$$

Ciò significa che α dipende dalle interazioni tra la sostanza considerata e le due fasi cromatografiche, che sono alla base della competizione tra le stesse che produce la separazione grazie ai diversi meccanismi di separazione che operano nella cromatografia. La selettività dipende da tali meccanismi di separazione.

Il fattore di separazione α è un parametro termodinamico, che non dipende dalle caratteristiche costruttive del sistema cromatografico (geometria, impaccamento, granulometria, ecc.).

Per avere una buona separazione è necessario che $\alpha > 1$, ovvero dei tempi di ritenzione diversi ma ciò non è sufficiente: se i due picchi sono molto larghi tenderanno a sovrapporsi anche con t' diversi nettamente.

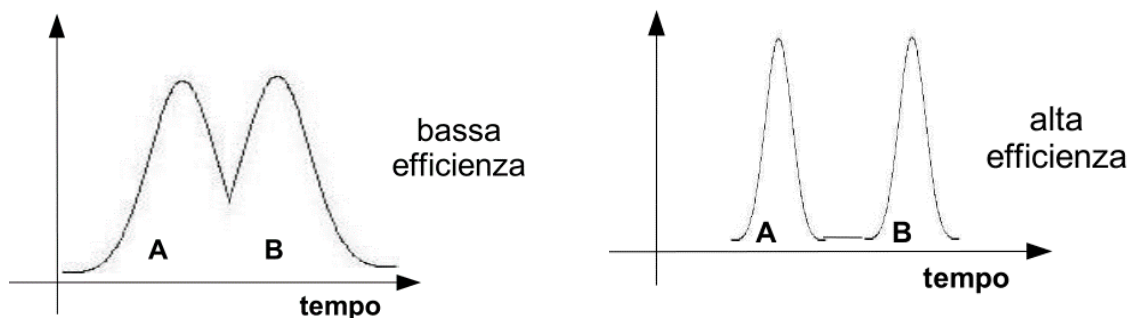


La qualità di una buona separazione cromatografica non dipende solo dalla selettività (diversità dei tempi di ritenzione) ma il sistema deve anche trasportare attraverso la colonna i diversi componenti senza provocarne la dispersione, in modo da avere picchi stretti e quindi non sovrapposti.

5.7.4 Efficienza

E' la capacità del sistema cromatografico di eluire tutte le particelle di una certa sostanza presente nel campione alla stessa velocità, in modo da formare bande strette e quindi picchi stretti nel cromatogramma.

Il parametro più semplice per esprimere l'efficienza è la larghezza di base w del picco; poiché spesso i picchi non sono simmetrici, si preferisce usare la **semilarghezza di base** $w/2$:



Nella figura sono messe a confronto due diverse colonne: hanno la stessa selettività (stessi t'_r di ritenzione) ma la seconda è più efficiente perché produce picchi molto più stretti e non sovrapposti.

Un parametro più significativo per esprimere l'efficienza di una colonna è il numero di **piatti teorici N**, derivante dall'altezza equivalente del piatto teorico H espressa dalla teoria dei piatti di van Deemter-Jones.

5.7.5 Risoluzione

E' il grado di separazione dei picchi prodotti da un sistema cromatografico. Se al rivelatore si presentano bande ben separate e compatte si hanno picchi stretti e non sovrapposti, che si possono facilmente utilizzare per l'analisi: in tal caso i picchi vengono definiti "ben risolti". La risoluzione R di due picchi adiacenti tiene conto sia della selettività che dell'efficienza e si valuta con la relazione:

$$R = \frac{t_{RB} - t_{RA}}{\frac{w_B + w_A}{2}} \quad R = \frac{2 \cdot (t_{RB} - t_{RA})}{w_B + w_A}$$

Se R è uguale o minore di 0,8 i picchi non sono risolti perché troppo sovrapposti; occorre cambiare le condizioni (colonna, temperatura, ecc.) per favorirne la separazione. Se R è uguale o maggiore di 1,5 allora la separazione si può considerare completa, cioè il tracciato dei 2 picchi adiacenti arriva fino alla linea di base.

Per **ottimizzare la risoluzione** e quindi migliorare i dati analitici si possono utilizzare i seguenti accorgimenti:

- scegliere una colonna con un numero di piatti teorici N più elevato
- ottimizzare il fattore di ritenzione k in modo che sia compreso tra 1,5 e 5 modificando la natura della fase stazionaria o della fase mobile
- abbassare la temperatura, compatibilmente con l'uscita di tutte le sostanze dalla colonna, perché al diminuire della temperatura il fattore di separazione α aumenta e quindi i picchi risultano maggiormente separati
- E' possibile modificare i parametri N, k e α durante l'eluizione ricorrendo ad una separazione a temperatura programmata (GC) al posto di una isoterma, oppure in gradiente di eluizione (LC) al posto di una isocratica, per ottenere gli stessi miglioramenti nella risoluzione R

5.7.6 Tempi di lavoro

Una separazione cromatografica accettabile richiede tempi di lavoro non troppo lunghi, ovvero si vuole ottenere una risoluzione elevata in tempi brevi, con un rapporto R/t_R elevato. In pratica si cerca di ottenere valori di R maggiori di 1,5 anche se valori troppo elevati (picchi troppo separati nel cromatogramma) richiederebbero tempi inaccettabili e costi maggiori (maggiore volume di fase mobile).

Per **ottimizzare il tempo di ritenzione** t_R senza peggiorare la risoluzione R si considera che t_R dipende da:

- risoluzione R
- selettività α
- fattore di ritenzione k
- altezza equivalente del piatto teorico H
- velocità lineare media \bar{u} della fase mobile

quindi per rendere minimi i tempi di lavoro bisogna agire sui suddetti fattori:

- R deve essere compreso tra 1 e 1,5 per ottenere picchi stretti e ben risolti
- la selettività α deve essere mantenuta a livelli elevati. Una volta scelta la fase fissa, si può aumentare la polarità della fase mobile oppure variare la temperatura di esercizio della colonna
- sono accettabili valori di k compresi tra 1,5 e 3. Una volta scelta la fase fissa, si può agire sulla sua granulometria, sulla sua quantità, sulla lunghezza e diametro interno della colonna, sulla polarità della fase mobile
- non conviene usare flussi di fase mobile troppo elevati, che farebbero diminuire l'efficienza, come indicato dall'equazione di van Deemter-Jones

5.7.7 Asimmetria dei picchi

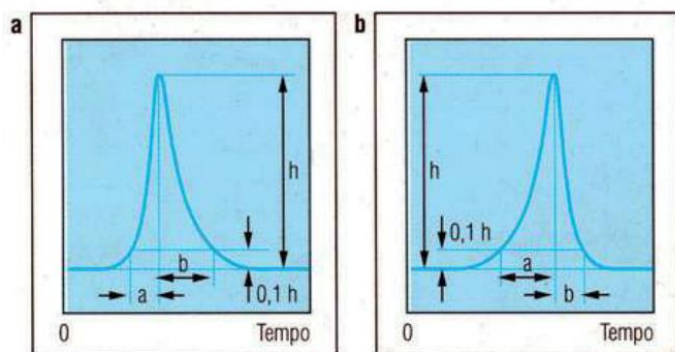
I picchi di un cromatogramma dovrebbero avere idealmente la forma di una gaussiana (segnale transiente) a causa della densità della banda di eluizione che arriva al rivelatore. Spesso presentano invece delle deviazioni dalla forma ideale, con formazione di **picchi asimmetrici**:

- tailing: il tracciato sale bruscamente fino al massimo e quindi decresce lentamente verso la linea di base
- fronting: il tracciato sale lentamente fino al massimo e quindi decresce bruscamente verso la linea di base

L'asimmetria del picco viene espressa dal **fattore o rapporto di asimmetria**:

$$A_s = \frac{b}{a}$$

a e b sono le distanze della curva dalla verticale passante per il punto di massimo, misurate al 10% dell'altezza del picco.



Ovviamente se $a = b$ il picco è perfettamente simmetrico; se $A_s > 1$ si ha il tailing, se $A_s < 1$ si ha il fronting. La formazione di picchi asimmetrici ostacola l'analisi del cromatogramma ed è dovuta a:

- introduzione in colonna troppo lenta della miscela da separare
- adsorbimento irreversibile della sostanza sulla fase stazionaria
- reazioni chimiche in colonna
- sovraccarico (overloading) per saturazione dei siti attivi, a causa della introduzione di una quantità eccessiva di campione
- variazioni della costante di distribuzione K_C al variare della concentrazione di analita, specie ad alte concentrazioni (dove la banda di eluizione è più densa). Ecco perché è opportuno lavorare con piccole quantità di campione, anche nella TLC

5.8 La fase stazionaria

Può essere solida (GSC) oppure liquida (GLC)

Fasi stazionarie solide per GSC: nella GSC il meccanismo di separazione è quello dell'adsorbimento, cioè la separazione dipende dalla forza dei legami con cui le molecole che compongono la miscela analizzata sono trattenute sulla superficie delle particelle solide che riempiono la colonna. La GSC viene applicata soprattutto all'analisi di miscele di gas permanenti, di idrocarburi leggeri e di composti bassobollenti in genere (alcoli, aldeidi, ecc.); di solito si usano colonne impaccate o capillari di tipo PLOT. La scelta della fase stazionaria viene fatta in base alla polarità delle sostanze da separare: con molecole molto polari si usano fasi stazionarie poco adsorbenti e viceversa. I materiali più usati sono:

1. Gel di silice: è una fase abbastanza polare, la cui attività può essere modificata riscaldando la colonna per 1-2 ore in presenza del solo carrier (si fa variare il grado di idratazione); garantisce buona riproducibilità ed è molto adatto per gas ed idrocarburi leggeri
2. Allumina: ha caratteristiche analoghe al gel di silice; trova un impiego limitato in colonne PLOT
3. Setacci molecolari: si tratta di microparticelle (di carbone o di zeoliti) aventi porosità controllata che abbinano il meccanismo dell'adsorbimento a quello dell'esclusione; sono adatte all'analisi dei gas permanenti

Fasi stazionarie liquide per GLC: è la tecnica più usata; nelle colonne impaccate e capillari SCOT la fase liquida, che provoca la separazione meccanismo di ripartizione, viene ancorata ad un solido avente i seguenti requisiti:

- inerzia chimica
- resistenza meccanica e termica, per non pregiudicare l'impaccamento della colonna
- buon grado di bagnabilità in modo che il liquido possa distribuirsi in modo uniforme
- bassa resistenza al flusso del carrier
- regolarità nella forma, idealmente sferica, delle particelle

Di solito vengono usati come materiali di supporto: kieselguhr, teflon, microsferi di vetro.

Il liquido di ripartizione, da depositare sul supporto solido o sulle pareti interne di una colonna capillare, deve possedere numerosi requisiti:

- bassa tensione di vapore (0,01-0,1 mmHg) nelle condizioni di lavoro, per minimizzare la perdita di liquido durante l'analisi e per non produrre interferenze nel rivelatore
 - elevata stabilità termica
 - elevata inerzia chimica per il supporto solido e per i componenti analizzati
 - buon effetto solvente sui componenti della miscela, pur con affinità diversa per ogni componente
 - bassa viscosità alle temperature di esercizio, per migliorare l'efficienza della colonna
- anche in questo caso i liquidi di ripartizione vengono suddivisi in classi a seconda della loro polarità, secondo cui si hanno 4 classi:
- prima classe (liquidi apolari): idrocarburi o siliconi
 - seconda classe (liquidi a bassa polarità): esteri di alcoli a lunga catena o derivati siliconici con sostituenti polari
 - terza classe (liquidi polari): poliglicoli, polialcoli e loro esteri
 - quarta classe (liquidi molto polari): glicoli, glicerina, idrossiacidi

Criteri di scelta per la fase stazionaria: sono i seguenti:

1. Per gas permanenti e per idrocarburi bassobollenti (C₁-C₁₀) si consiglia di usare fasi stazionarie solide
2. Per miscele di composti con polarità simile ma con p.eb. diversi non è necessaria una fase stazionaria molto selettiva per cui se ne usa apolare; in tal modo vengono eluiti per primi i composti più volatili
3. Per miscele di composti con polarità molto diverse ma con p.eb. simili si possono usare sia fasi polari che non polari. Con quelle polari i composti più polari, più affini alla fase stazionaria, vengono trattenuti maggiormente; su quelle apolari le sostanze polari sono trattenute meno perché sono rese più volatili dalla repulsione con la fase stazionaria
4. Per miscele contenenti sia molecole non polari (come ad esempio il n-esano) sia sostanze polarizzabili (come ad es. il benzene) si usano fasi stazionarie molto polari, che polarizzano gli aromatici stabilendo legami dipolo-dipolo indotto, mentre trattengono poco i composti non polari

Criteri di scelta per il tipo di colonna: sono i seguenti:

1. Le colonne impaccate hanno maggiore capacità ma devono essere evitate quando sia necessario isolare un gran numero di composti, perché riescono a separare solo quelli principali; vengono inoltre utilizzate per la GC preparativa, in cui ogni componente viene ulteriormente analizzato con altre tecniche
2. Le colonne capillari, che hanno efficienza elevata, permettono di separare a fondo anche miscele molto complesse, ma sono più difficili da gestire correttamente

5.9 La fase mobile

Il gas di trasporto, o **carrier**, deve essere scelto accuratamente in funzione delle caratteristiche dell'apparecchio utilizzato; deve possedere precisi requisiti:

- elevata inerzia chimica verso la colonna, la fase fissa ed i componenti da separare
- elevato grado di purezza, non inferiore al 99,99%, per evitare interferenze
- proprietà specifiche in relazione al rivelatore impiegato: per es. deve avere elevata conducibilità termica se si utilizza un HWD

Tenendo conto di queste caratteristiche, i carrier più usati sono i seguenti:

- azoto N₂: è di uso generale e di relativamente basso costo
- elio He: è indispensabile solo per l'HWD; negli altri casi può essere sostituito dall'azoto, per ragioni di costo
- idrogeno H₂: è ottimo per l'HWD ed indispensabile per il FID (dove serve come combustibile), ma è costoso e pericoloso
- argon Ar: ha maggiore densità e quindi riduce la diffusione dell'analita in colonna ma aumenta i tempi di eluizione

Dopo aver scelto il tipo di carrier, è essenziale determinarne la **portata ottimale**: infatti, a seconda della portata di carrier, possono variare sensibilmente i risultati della separazione cromatografica, perché varia l'**efficienza** della colonna. Esistono numerose equazioni che correlano la portata ottimale con l'efficienza della colonna. Una delle più usate per valutare la portata ottimale del carrier è l'**equazione di Van Deemter-Jones**, valida per le colonne impaccate (per quelle capillari le equazioni sono più complesse):

$$H = A + \frac{B}{\bar{u}} + C \cdot \bar{u}$$

H: altezza equivalente del piatto teorico

A: coefficiente di cammino multiplo

B: coefficiente di diffusione molecolare longitudinale

C: coefficiente di trasferimento di massa

\bar{u} : velocità lineare media della fase mobile

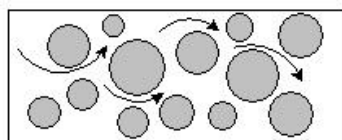
Questa equazione è legata all'analogia tra la cromatografia (equilibri competitivi tra fase fissa e fase mobile) e la distillazione (equilibri liquido-vapore): in entrambi i casi vi è la ripartizione di più componenti tra due fasi; si definisce quindi l'**altezza equivalente del piatto teorico H** come la lunghezza di colonna corrispondente ad un equilibrio completo tra fasi, in analogia al piatto di una colonna di distillazione, che permette un equilibrio completo L-V. Il termine H è legato all'efficienza della colonna, cioè alla sua capacità di separare nettamente i componenti eluiti: al diminuire di H, migliora l'equilibrio tra le fasi e quindi aumenta il numero di piatti teorici N presenti in una colonna di una determinata lunghezza. Ad esempio una comune colonna impaccata di 2 m si hanno 4.000-8.000 piatti teorici, mentre in una comune colonna capillare lunga 80-100 m si possono avere 50.000-150.000 piatti teorici (in colonne più lunghe si arriva fino a 700.000!): aumenta così enormemente il contatto tra le fasi e quindi migliora nettamente l'efficienza complessiva della colonna.

L'equazione di Van Deemter-Jones è in realtà la somma di tre diverse equazioni, ognuna delle quali fornisce un contributo alla determinazione di H:

1. Cammini multipli (diffusione microvorticososa), espressa dal termine A: nelle colonne impaccate, a causa della non perfetta uniformità della distribuzione delle particelle solide costituenti la fase stazionaria, il carrier tende a seguire percorsi preferenziali (multiple path), dove incontra la minore resistenza al flusso. Il termine A dell'equazione è stimato dalla seguente relazione:

$$A = 2 \cdot \lambda \cdot d_p$$

dove λ è una costante associata alla distribuzione granulometrica delle particelle e d_p è il diametro medio delle particelle del riempimento.



cammini preferenziali (microvorticosità) all'interno della fase fissa non del tutto omogenea

Il flusso di carrier, invece di essere uniforme in tutta la sezione di colonna, segue i percorsi dove i granuli solidi sono meno impaccati e quindi incontra meno resistenza. Il relativo termine dell'equazione di Van Deemter-Jones è semplicemente:

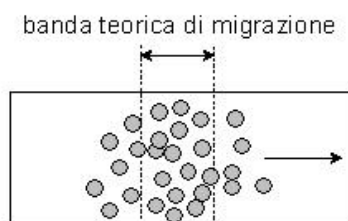
$$H = A$$

Come si vede A non dipende dalla velocità del carrier ma solo dall'uniformità dimensionale delle particelle del riempimento. Per rendere minimo A e quindi H (aumentando così il numero N di piatti teorici e quindi l'efficienza della colonna) è necessario ridurre d_p e migliorare l'uniformità dell'impaccamento

2. Diffusione molecolare longitudinale, espressa dal termine B: quando le molecole eluite vengono trasportate dal carrier, invece di muoversi sotto forma di una "banda" molecolare compatta, tendono anche a diffondere lateralmente e quindi a disperdersi lungo il percorso. Il termine B è valutabile mediante:

$$B = 2 \cdot \gamma \cdot D_M$$

dove γ è il fattore di tortuosità (o di ostruzione) dovuto dall'impaccamento della colonna, cioè dalla distribuzione geometrica degli spazi disponibili per la fase mobile, mentre D_M è il coefficiente di diffusione molecolare del componente eluito nella fase mobile.



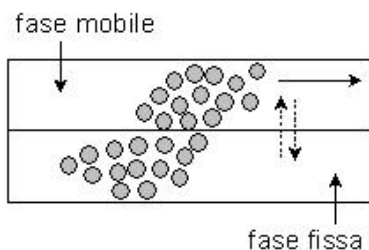
Per rendere minimo B e quindi H è necessario ridurre γ con particelle di riempimento disposte in modo uniforme (anche se non necessariamente piccole) all'interno della colonna e migliorare la diffusività dell'eluente. Il relativo termine dell'equazione di Van Deemter-Jones è il seguente:

$$H = \frac{B}{\bar{u}}$$

Esaminando tale relazione è evidente che H e \bar{u} sono inversamente proporzionali: una bassa velocità di flusso \bar{u} aumenterà il fenomeno della diffusione molecolare longitudinale aumentando H e quindi

diminuendo l'efficienza della colonna, mentre una elevata velocità di flusso ridurrà H migliorando l'efficienza perché tenderà a mantenere compatta la banda di migrazione non dando alle molecole il tempo di diffondere longitudinalmente

3. **Resistenza al trasferimento di massa**, espressa dal termine C: dipende dal fatto che l'equilibrio tra fase fissa e fase mobile non è istantaneo ma richiede un certo tempo; quindi le molecole eluite si muovono verso l'uscita più velocemente nel carrier gassoso che nel liquido di ripartizione: ne consegue un certo "ritardo" nel trasferimento di massa tra le due fasi, che "deforma" la banda molecolare di migrazione:

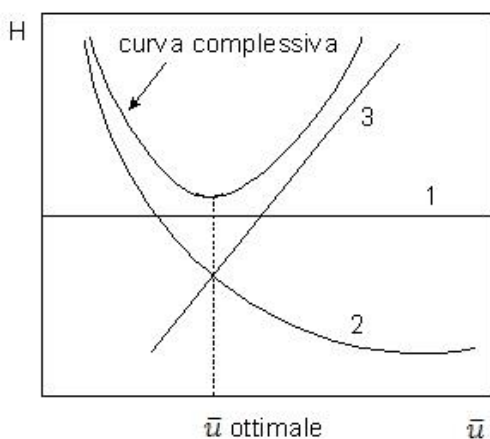


Il termine C viene ridotto, insieme a H, utilizzando liquidi con piccolo spessore e bassa viscosità. Il relativo termine dell'equazione di Van Deemter-Jones è il seguente:

$$H = C \cdot \bar{u}$$

Esaminando la relazione si vede che \bar{u} e H sono direttamente proporzionali, quindi una elevata velocità di flusso aumenta H riducendo il numero di piatti teorici e peggiorando l'efficienza della colonna; al contrario una ridotta velocità di flusso riduce H perché deforma in modo meno netto la banda di migrazione, aumentando l'efficienza della colonna a causa dell'aumento del numero dei piatti teorici.

Per quanto detto i vari aspetti sono in contrasto tra loro: una elevata velocità di flusso \bar{u} riduce la diffusione molecolare longitudinale ma aumenta la resistenza al trasferimento di massa. E' quindi opportuno considerare tutti e tre i contributi nel loro insieme riportandoli nel seguente grafico:



$$(1) H = A$$

$$(2) H = \frac{B}{\bar{u}}$$

$$(3) H = C \cdot \bar{u}$$

L'andamento complessivo è espresso dalla curva risultante dalla somma dei 3 contributi. Si vede che il valore ottimale di velocità media di flusso del carrier è quello corrispondente al minimo della curva complessiva, in quanto per un valore di **H minimo** si ha il **massimo numero di piatti teorici N** e quindi si rende massima l'efficienza della colonna, cioè la capacità di separare i componenti della miscela analitica.

Dal grafico si osserva inoltre che a basse velocità di flusso H dipende soprattutto dalla diffusione molecolare longitudinale mentre ad elevate velocità di flusso prevalgono sul valore di H gli aspetti relativi alla resistenza al trasferimento di massa.

Ma la portata del carrier è data da: $Q = \bar{u} \cdot S$ dove S è la sezione della colonna e quindi l'equazione di Van Deemter consente di valutare prima la velocità di flusso ottimale e quindi la portata ottimale del carrier da utilizzare nella separazione cromatografica. Il controllo della portata di carrier può essere effettuato mediante appositi flussimetri che si trovano sul gascromatografo.

5.10 La temperatura

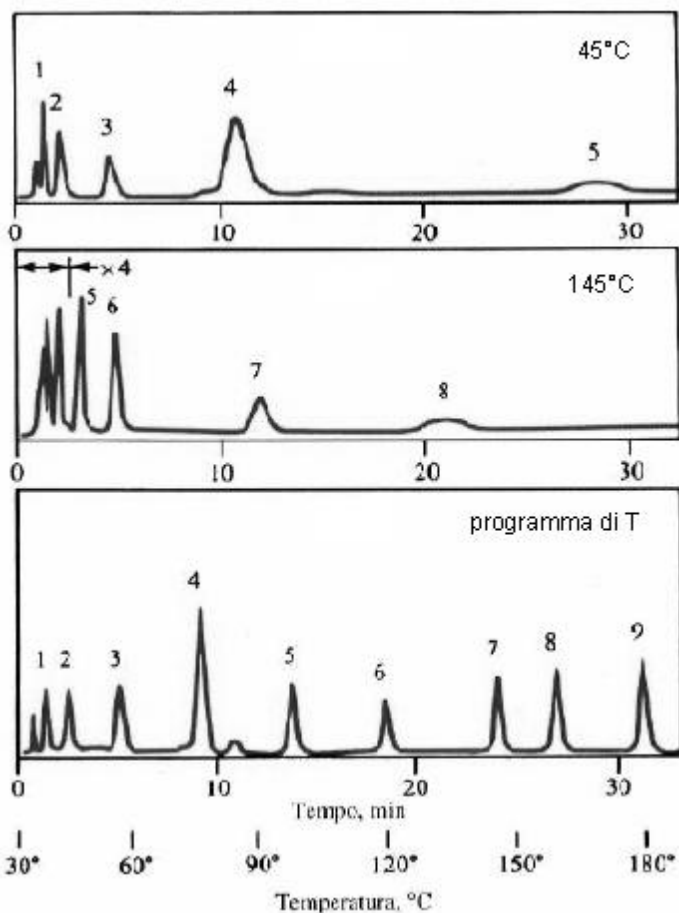
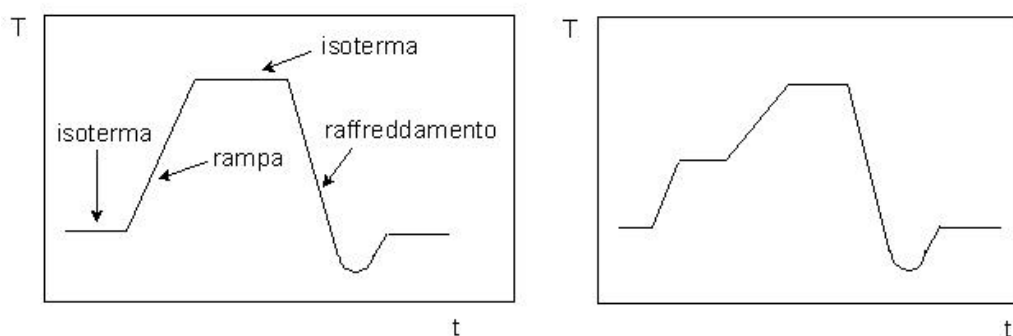
E' un altro fattore determinante per la buona riuscita della separazione gascromatografica e va scelta con cura in relazione ai risultati che si devono ottenere. In generale si può dire che:

- una temperatura troppo alta riduce i tempi di eluizione ma peggiora la separazione tra i componenti

- una temperatura troppo bassa produce una buona separazione ma è associata a tempi di eluizione inaccettabili

Ovviamente si dovrà utilizzare una temperatura che risulti il miglior compromesso tra tutti i fattori di separazione gascromatografica. Si può operare in due modi:

1. **Separazione isoterma:** si imposta una temperatura sull'apparecchio che viene mantenuta costante per tutta la durata dell'analisi. Anche la temperatura influenza l'efficienza della colonna, in modo analogo alla velocità lineare del carrier, variando il numero di piatti teorici presenti in colonna; inoltre la temperatura non può essere inferiore al punto di ebollizione del componente meno volatile della miscela analizzata, altrimenti questo condenserebbe all'interno della colonna, dopo essere stato vaporizzato nell'iniettore (che di solito ha un sistema autonomo di termostatazione). Dovendo mettere a punto una nuova metodica analitica si devono effettuare diverse prove allo scopo di trovare la temperatura ottimale, anche mediante confronto con casi di letteratura simili e tramite prove su standard. La separazione isoterma è un metodo analitico adatto a miscele formate da componenti con volatilità simile.
2. **Separazione a temperatura programmata:** quando i componenti di una miscela hanno volatilità molto diversa, la scelta di una temperatura unica di separazione ottimale diventa un problema e si rischia di non riuscire a completare la separazione. In questi casi la temperatura viene programmata, cioè viene variata in modo prefissato durante l'eluizione, utilizzando un profilo di temperatura come quello mostrato di seguito:



Ogni profilo termico può essere programmato dall'operatore per adattarlo alla miscela analizzata. In genere si inizia a bassa temperatura, per favorire l'uscita dei componenti più volatili, che danno in tal modo picchi ben distinti; in seguito si cresce linearmente (o non linearmente) la temperatura per favorire l'uscita dei componenti meno volatili; la variazione della temperatura viene effettuata da un apposito programmatore di temperatura.

Il profilo termico può essere anche più articolato, come quello mostrato precedentemente, nel caso di miscele di particolare complessità.

Un profilo termico è pertanto formato da:

- una o più isoterme (per esempio inizialmente si mantiene la temperatura a 90°C per 6')
- una o più fasi di rampa, per la quale si fissa la temperatura di arrivo ed il gradiente di riscaldamento (per esempio si riscalda di 200°C, da 90°C a 290°C, con una velocità di salita di 20°C/min). Ogni rampa collega due isoterme successive
- al termine dell'eluizione si ha una fase di raffreddamento, che riporta la temperatura al valore iniziale e predispone l'apparecchio per una successiva analisi

5.11 Tecnica operativa

L'esecuzione di un'analisi gascromatografica è abbastanza complessa e richiede procedure di lavoro accuratamente standardizzate, per produrre risultati significativi. Le varie fasi analitiche possono essere schematizzate nel modo seguente:

1. Messa in pressione dell'impianto: si aprono le valvole delle bombole di gas (carrier, alimentazione dei rivelatori, ecc.) e, mediante i riduttori di pressione, si impostano le pressioni opportune dei gas e quindi i loro flussi
2. Preparazione e messa a punto della colonna: si installa la colonna più adatta, si condiziona facendo passare il solo carrier per alcune ore ad una temperatura di 20-25°C superiore a quella utilizzata nell'analisi e quindi si registra un cromatogramma per verificare il posizionamento della linea di base
3. Messa in funzione e verifica dei rivelatori
4. Impostazione dei parametri analitici: temperatura della colonna (sua eventuale programmazione), temperatura dell'iniettore, pressione e flusso del carrier, ecc.
5. Iniezione di un opportuno volume di campione
6. Registrazione del gascromatogramma

5.12 Analisi qualitativa

Dopo aver registrato il cromatogramma, si può effettuare l'analisi qualitativa, cioè individuare i componenti della miscela analizzata. Il parametro analitico utilizzato è il **tempo di ritenzione**, cioè il tempo necessario per l'uscita di un componente dal sistema cromatografico; tuttavia questo generico parametro dipende da numerosi fattori, che non lo rendono sempre esente da errori di interpretazione, come:

- geometria della colonna (diametro e lunghezza)
- tipo e quantità della fase stazionaria
- temperatura della colonna
- natura, pressione e flusso del carrier
- quantità di campione iniettata

Per tale motivo occorre fare attenzione a quale tempo di ritenzione fare riferimento:

1. Tempo di ritenzione assoluto (t): è misurato a partire dall'iniezione del campione; dipende dai fattori menzionati precedentemente e quindi ha uno scarso significato qualitativo perché non è sempre riproducibile
2. Tempo di ritenzione corretto (t'): è misurato a partire dall'uscita dell'aria e si calcola: $t' = t - t_a$ essendo t_a il tempo morto, relativo al componente non trattenuto in colonna (aria). E' il vero parametro qualitativo perché corrisponde al tempo di trattenimento del componente sulla fase fissa. Vari autori hanno elaborato tabelle di confronto mediante le quali è possibile, in condizioni standardizzate (tipo di carrier, di fase stazionaria, temperatura, ecc.) risalire alla natura del componente individuato
3. Tempo di ritenzione relativo (t_R): per la generica sostanza A si ottiene dal rapporto

$$t_{R,A} = \frac{t_A}{t_S}$$

dove t_A è il tempo di ritenzione assoluto della sostanza A e t_S il tempo di ritenzione assoluto di una sostanza S presente nella miscela e considerata come standard di riferimento. Il tempo di ritenzione relativo dipende solo dalla fase stazionaria e dalla temperatura e quindi permette di ottenere un netto miglioramento in

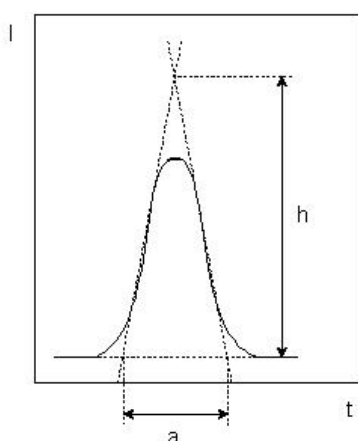
termini di riproducibilità. Anche qui vi sono varie tabelle (idrocarburi, alcoli, acidi grassi, ecc.) dove sono indicati i t_R per le varie categorie di sostanze. Ovviamente t_R potrà essere maggiore a minore di 1; se uguale a 1 corrisponde alla sostanza utilizzata come standard

5.13 Analisi quantitativa

Dopo aver effettuato l'analisi qualitativa, si passa a determinare la quantità presente di ogni componente della miscela. Il parametro quantitativo è l'**area del picco** di eluizione (trattandosi di un segnale transiente), che risulta proporzionale alla concentrazione della sostanza rappresentata.

Dopo lo sviluppo del cromatogramma vi è quindi la necessità di calcolare le aree dei picchi; questo calcolo può essere effettuato in due modi:

- a) metodi grafici: il metodo classico è quello della triangolazione, in cui il picco viene approssimato ad un triangolo isoscele:

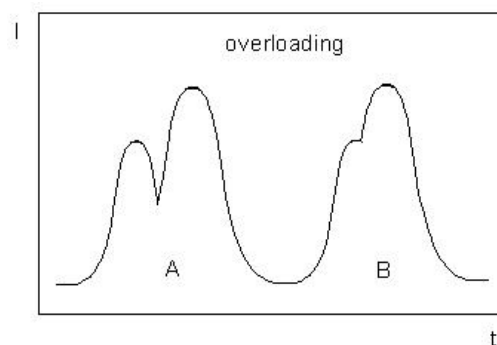
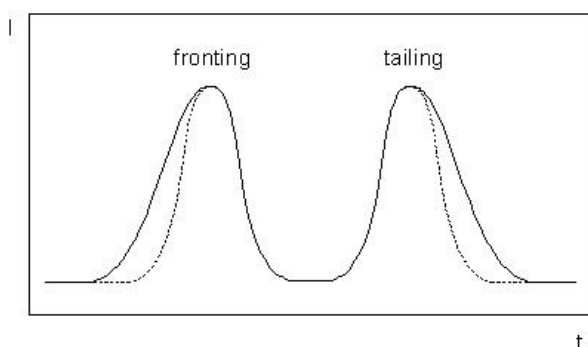


In questo caso l'area del picco S si calcola mediante:

$$S = \frac{a \cdot h}{2}$$

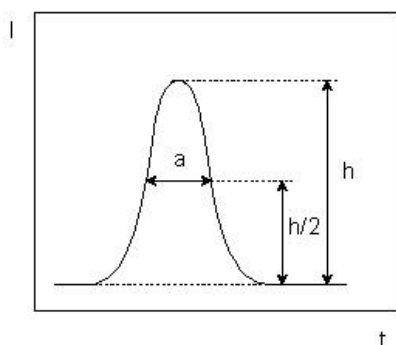
Questo metodo fornisce risultati accettabili solo se il picco è perfettamente simmetrico: infatti il triangolo isoscele comprende il vertice esterno al picco cromatografico che equivale con una discreta precisione alla somma dei due settori di base del picco che vengono esclusi.

Tuttavia spesso i picchi non sono simmetrici perché presentano i fenomeni del “fronting” e del “tailing”: tali deformazioni del picco rendono approssimativo il calcolo dell'area mediante il metodo della triangolazione.



Inoltre talora si può avere il fenomeno detto “overloading” cioè la sovrapposizione tra due picchi successivi. Se tale fenomeno non è molto accentuato (caso A) è possibile distinguere i due picchi calcolando le singole aree; se al contrario la sovrapposizione è maggiore (caso B) allora si ha una “spalla” che non permette di distinguere le singole aree; in questo caso bisogna cambiare le condizioni operative (portata del carrier, temperatura, ecc.) per separare meglio i due picchi e consentire la valutazione quantitativa delle due sostanze.

Quando i picchi non sono simmetrici si può ricorrere al metodo della gaussiana per il calcolo dell'area:



secondo questo metodo il picco viene approssimato ad una curva gaussiana, dall'integrazione della quale si ottiene l'equazione:

$$S = 1,066 \cdot a \cdot h$$

dove h è l'altezza del picco ed a è la larghezza del picco misurata a metà della sua altezza

- b) integrazione computerizzata: nei moderni gascromatografi degli integratori elettronici forniscono l'area dei singoli picchi, fornendo come risultati dei valori numerici rappresentativi di tali aree; questo metodo riesce a fornire risultati accettabili anche in presenza di picchi notevolmente sovrapposti, che non sarebbero elaborabili con metodi grafici.

Dopo aver calcolato l'area di ogni singolo picco, si passa all'analisi quantitativa vera e propria, che può essere effettuato con uno dei seguenti metodi:

1. Normalizzazione interna: è il metodo usato quando il cromatogramma è completamente sviluppato (sono usciti tutti i componenti della miscela) e ogni sostanza è rappresentata da un picco ben distinto e separato; il principio sfruttato è la proporzionalità delle aree e delle concentrazioni; rapportando l'area di ogni picco S_i alla somma di tutte le aree si ottiene la % di ogni componente

$$p_i = \frac{S_i}{\sum_1^n S_i}$$

p_i : percentuale di un qualsiasi componente
 S_i : area del picco
 F_i : fattore di correzione
 $S_i \cdot F_i$: area corretta

$$p_i = \frac{S_i \cdot F_i}{\sum_1^n (S_i \cdot F_i)}$$

Tuttavia questa proporzionalità è rigorosamente vera solo se il rivelatore fosse totalmente aspecifico, cioè con la stessa sensibilità verso tutti i componenti; di solito questo non è del tutto vero e quindi si introduce il fattore di correzione F_i , che esprime la non totale aspecificità del rivelatore. La determinazione di F_i richiede una calibrazione preliminare dello strumento: si registra il cromatogramma di una miscela standard in cui sono presenti, in % nota, tutte le sostanze della miscela analitica; si sceglie arbitrariamente un composto come riferimento R a cui si attribuisce $F_R = 1$, per cui l'equazione precedente diventa:

$$p_R = \frac{S_R \cdot F_R}{\sum_1^n (S_i \cdot F_i)} = \frac{S_R}{\sum_1^n (S_i \cdot F_i)} \quad \sum_1^n (S_i \cdot F_i) = \frac{S_R}{p_R}$$

Che sostituito nell'equazione precedente fornisce:

$$p_i = \frac{S_i \cdot F_i}{\sum_1^n (S_i \cdot F_i)} \quad p_i = \frac{S_i \cdot F_i \cdot p_R}{S_R} \quad F_i = \frac{p_i}{p_R} \cdot \frac{S_R}{S_i}$$

Essendo noti p_R , p_i e misurando dal cromatogramma le aree S_R ed S_i , si valutano, per quel tipo di rivelatore, i coefficienti F_i dei singoli componenti della miscela standard, da utilizzare per la miscela analitica. Naturalmente, in modo approssimato, si possono porre uguali a 1 tutti i coefficienti correttivi, ipotizzando una totale aspecificità del rivelatore: i tempi di analisi si accorciano ma le % ottenute sono approssimative.

2. Standardizzazione interna: consente di ottenere risultati più accurati ed affidabili; non fa riferimento al picco dell'analita ma al rapporto tra l'area di questo e l'area di un componente (lo standard interno SI) aggiunto alla miscela analitica in quantità nota; si preparano in tal modo delle rette di taratura, ovviando ai problemi tecnici dovuti alla riproducibilità del sistema di iniezione ed alla sensibilità del rivelatore. Questo metodo è indispensabile quando non è possibile giungere allo sviluppo completo del cromatogramma o non è possibile calcolare i coefficienti F di correzione per tutti i componenti analizzati.

Lo SI, aggiunto in quantità nota alla miscela analitica, deve soddisfare diversi requisiti:

- deve essere assente dalla miscela analitica
- deve dare un picco ben risolto rispetto agli altri componenti
- deve avere un tempo di ritenzione simile alle diverse sostanze presenti nel campione
- deve essere presente in concentrazione simile ai diversi componenti del campione e, se possibile, deve essere strutturalmente simile ad esso, in modo che il rivelatore manifesti la stessa sensibilità nei suoi confronti
- non deve contenere impurezze
- non deve reagire col campione

Si pesano opportune quantità di campione e di SI e si sciolgono in un unico volume di solvente, in modo che la soluzione risultante sia all'1% sia nello SI che nel campione e quindi si procede all'iniezione ed allo sviluppo del cromatogramma. Si avrà la seguente relazione di proporzionalità:

$$M_i: M = p_i: 100$$

dove M_i è la massa (mg) dell'analita presente in M mg di prodotto pesato e p_i è la % di analita presente nel prodotto analizzato. Inoltre esiste proporzionalità tra aree dei picchi e concentrazione, in quanto SI ed

analita sono stati sciolti in un unico volume di solvente; la proporzionalità vale anche per le masse, essendo la concentrazione C pari a (massa/volume):

$$S_{SI} : M_{SI} = S_i : M_i$$

dove S_{SI} è l'area del picco dello SI, S_i è l'area del picco di ogni analita, M_{SI} è la massa di SI pesata ed M_i la massa dell'analita, da calcolare. Da questa proporzione si ricava:

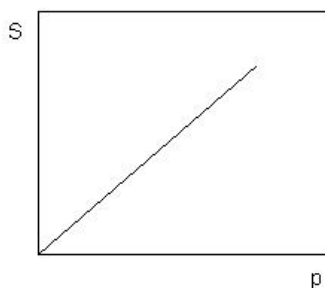
$$M_i = \frac{M_{SI} \cdot S_i}{S_{SI}} \quad \text{che sostituita nella proporzione precedente fornisce:}$$

$$M_i : M = p_i : 100 \quad \frac{M_i}{M} = \frac{p_i}{100} \quad \frac{M_{SI} \cdot S_i}{S_{SI}} \cdot \frac{1}{M} = \frac{p_i}{100} \quad p_i = \frac{100 \cdot M_{SI} \cdot S_i}{S_{SI} \cdot M}$$

che consente, in base ai dati delle pesate iniziali ed al calcolo delle aree dei picchi del cromatogramma, di calcolare le percentuali P_i di ogni singolo componente della miscela.

Anche in questo caso, se il rivelatore non potesse essere considerato totalmente aspecifico, occorre introdurre i coefficienti correttivi delle aree dei picchi, da valutare nel solito modo:

$$p_i = \frac{100 \cdot M_{SI} \cdot F_i \cdot S_i}{S_{SI} \cdot M}$$



Mediante questo metodo è possibile realizzare delle vere e proprie rette di taratura, riportando in diagramma i dati delle aree S_i e delle relative percentuali P_i ottenute da cromatogrammi di miscele standard, utilizzando la regressione lineare per tracciare la retta di taratura.

La retta può in seguito essere utilizzata per leggere direttamente la % di quel componente in **varie miscele analitiche** e questa possibilità costituisce il principale vantaggio del metodo che, per altri versi, è piuttosto lungo e laborioso.

3. Standardizzazione esterna: è analogo al metodo precedente ma qui lo standard e l'analita sono presenti in due soluzioni diverse; inoltre lo standard esterno SE deve essere la stessa sostanza presente nella miscela analitica. Si sottopongono a cromatografia due volumi rigorosamente identici di due diverse soluzioni: una prodotta sciogliendo in un certo volume di solvente lo SE, l'altra ottenuta sciogliendo, in un identico volume di solvente, la soluzione analitica. Al termine si misurano le aree dei 2 picchi che rappresentano lo SE e l'analita (che sono in realtà la stessa sostanza); si ha la seguente relazione di proporzionalità:

$$p_i : S_i = p_{SE} : S_{SE} \quad \text{da cui si ricava:} \quad p_i = p_{SE} \cdot \frac{S_i}{S_{SE}}$$

dove P_{SE} è nota e le aree S_{SE} ed S_i sono calcolate dal gascromatogramma. Anche in questo caso è possibile la costruzione di rette di taratura, per determinare in modo immediato la % di un determinato componente presente in diverse miscele analitiche.

E' un metodo che richiede tempi relativamente lunghi e richiede l'uso di particolari microsiringhe, molto costose, che garantiscono l'identità dei due volumi iniettati.

5.14 Applicazioni gascromatografiche

Sono numerose, anche se oggi si preferisce usare, quando possibile, la tecnica HPLC; alcuni esempi:

1. Analisi di frazioni petrolifere (benzine, gasoli, ecc.): si utilizzano generalmente colonne impaccate o capillari e il FID come rivelatore, per i controlli di qualità sui prodotti delle raffinerie
2. Analisi delle sostanze grasse, come ad esempio gli oli di oliva: essi sono miscele di trigliceridi liquidi, che hanno una modesta volatilità; pertanto vengono preliminarmente metilati, cioè fatti reagire in opportune condizioni con metanolo, in modo da provocare una transesterificazione: gli acidi grassi che inizialmente sono legati alla glicerina nei trigliceridi, vengono trasformati in esteri metilici, maggiormente volatili e quindi sottoposti a GLC, giungendo a determinare la composizione in acidi grassi dell'olio, allo scopo di verificare eventuali sofisticazioni ed alterazioni del prodotto. Si utilizzano colonne impaccate o capillari e FID come rivelatore

3. Analisi delle bevande alcoliche: vengono sottoposti a GLC i vini, le acqueviti ed i liquori, iniettati direttamente in colonna, per la ricerca delle componenti alcoliche, per es. del metanolo. Anche in questo caso si utilizzano colonne impaccate o capillari ed il FID
4. Analisi dei composti clorurati (pesticidi, diserbanti, ecc.) presenti nell'acqua: si può effettuare con un gascromatografo dotato di ECD.

6. HPLC

6.1. Principi ed applicazioni

La cromatografia in fase liquida ad elevate prestazioni (HPLC - High Performance Liquid Chromatography) rappresenta la naturale evoluzione della cromatografia su colonna a bassa pressione; con questa tecnica si possono separare miscele complesse anche in pochi minuti ed è possibile effettuare sia l'analisi qualitativa che quella quantitativa.

La **fase mobile è costituita da un liquido a bassa viscosità** mentre la fase stazionaria è costituita da microparticelle solide porose, eventualmente rivestite da una fase liquida; la fase stazionaria è accuratamente impaccata in colonne con un diametro interno di pochi mm e lunghe da 3 a 50 cm. Poiché le particelle solide hanno un diametro molto piccolo (da 3 a 10 μm), la fase stazionaria presenta un'elevata resistenza al flusso della fase mobile, che può essere superata solo introducendo quest'ultima mediante apposite pompe, in grado di fornire una pressione da 70 a 400 atm, con una portata costante; è proprio questa esigenza che ha limitato per molti anni lo sviluppo di questa tecnica, diventata di impiego comune solo negli ultimi decenni, grazie alla produzione di pompe sempre più efficienti.

La tecnica HPLC presenta diverse varianti, che possono essere classificate secondo vari criteri. Una prima classificazione, è basata sulla polarità delle due fasi:

- a) cromatografia normale (NPC - Normal Phase Chromatography): utilizza una fase stazionaria polare ed una fase mobile apolare
- b) cromatografia a fase inversa (RPC - Reverse Phase Chromatography): utilizza una fase stazionaria apolare ed una fase mobile polare

Basandosi sul meccanismo principale di separazione e sulla natura delle fasi, si possono avere:

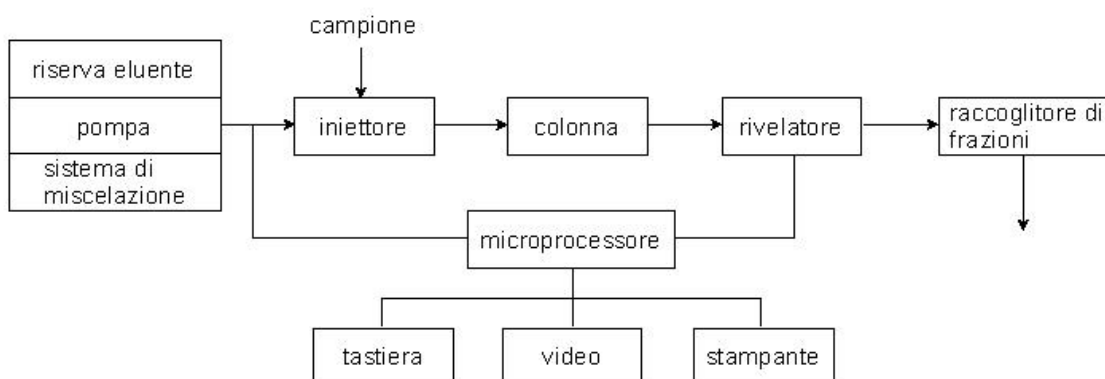
- a) cromatografia di adsorbimento liquido-solido (LSC - Liquid Solid Chromatography), in cui la fase stazionaria è costituita da un solido adsorbente
- b) cromatografia di ripartizione liquido-liquido (LLC - Liquid Liquid Chromatography) in cui la fase stazionaria è costituita da un liquido immobilizzato su di un solido inerte
- c) cromatografia di esclusione (SEC - Size Exclusion Chromatography) in cui la fase stazionaria è un solido a microporosità controllata
- d) cromatografia di scambio ionico (IEC - Ion Exchange Chromatography) in cui la fase stazionaria è una resina a scambio ionico

Le applicazioni dell'HPLC sono molto vaste: questa tecnica tende a sostituire la GLC in quanto, operando a temperatura ambiente, non presenta i noti problemi di vaporizzazione del campione; inoltre viene sfruttato il potere solvente di entrambe le fasi (mentre il carrier della GLC è praticamente inerte) e ciò migliora l'efficienza e la selettività della separazione, riducendo i tempi di lavoro.

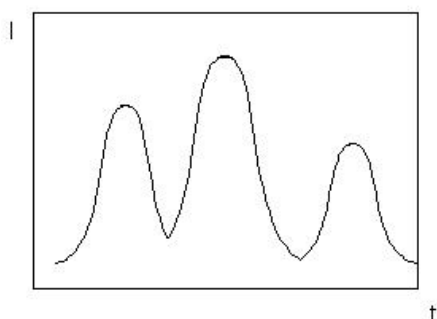
6.2. Schema di un cromatografo HPLC

Lo schema è simile a quello di un apparecchio per la GLC; l'eluente (o solvente), contenuto in una riserva, viene prelevato da una pompa, miscelato col campione all'interno dell'iniettore e quindi fatto passare nella colonna cromatografica. All'uscita attraversa un rivelatore differenziale che, tramite un microprocessore, confronta una qualche caratteristica dell'eluente puro con il liquido uscente dalla colonna, rivelando i componenti della miscela analitica in ordine di eluizione.

All'uscita del sistema cromatografico vi può essere un raccoglitore di frazioni, allo scopo di prelevare i vari componenti (cromatografia preparativa) da sottoporre ad ulteriori analisi con altre tecniche: in questo caso l'HPLC viene usata come tecnica di separazione di miscele.



Il microprocessore comanda inoltre l'eventuale sistema di miscelazione, che può variare la composizione dell'eluente in modo prefissato durante lo sviluppo del cromatogramma: questa tecnica è detta gradiente di eluizione.



Anche l'HPLC produce in uscita un cromatogramma (su video oppure registrato o stampato su carta) caratterizzato da una serie di picchi di eluizione, di forma gaussiana, ognuno corrispondente ad un componente della miscela analitica.

La posizione, attraverso il tempo di ritenzione, e l'area dei picchi, come nella GLC, consentono di effettuare, rispettivamente, l'analisi qualitativa e quantitativa.

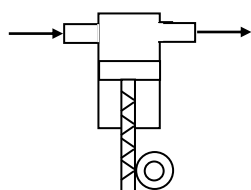
6.3. Pompe

Devono possedere numerosi **requisiti**:

- deve fornire elevate pressioni di ingresso in colonna (da 50-60 atm fino a 400 atm in qualche caso)
- deve mantenere un flusso di eluente il più possibile costante e riproducibile
- deve consentire un'ampia gamma di flussi (da 0,5 a 10 ml/min)
- deve avere un volume morto (volume di liquido non espulso dalla pompa) molto piccolo, per non alterare l'eluizione quando si lavora a composizione variabile dell'eluente
- deve avere un adeguato sistema di smorzamento delle pulsazioni (se la portata è pulsante)
- deve avere una notevole inerzia chimica
- deve avere un'elevata autonomia
- deve consentire rapide operazioni di ricambio della fase mobile e di pulizia
- deve essere poco rumorosa ed ingombrante

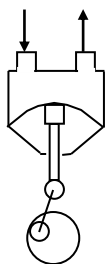
Sono state proposte varie tipologie di pompe, ognuna delle quali presenta sia vantaggi che svantaggi:

1. Pompa a pistone: è costituita da un piccolo pistone, collegato ad una vite senza fine, collegata a sua volta, mediante un opportuno ingranaggio, ad un albero motore:



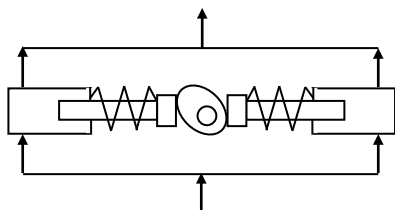
il pistone si muove all'interno di un cilindro con un volume di circa 200 ml, sufficienti per una intera eluizione; inizialmente viene riempito il cilindro con l'eluente e quindi viene erogato a pressione e portata costanti, mediante un sistema di valvole automatiche. Questa pompa non consente di lavorare a composizione variabile di eluente ed è piuttosto difficile da pulire; al termine di ogni analisi è necessario ricaricarla con l'eluente.

2. Pompa a membrana: in questo caso il pistone non è a diretto contatto con l'eluente ma poggia su di una membrana di gomma, che deformandosi ciclicamente alterna una fase di aspirazione dell'eluente ad una di mandata:



il pistone a contatto con la membrana può produrre al massimo 60-70 pulsazioni al minuto e quindi è necessaria la presenza di smorzatori di pulsazione, per rendere più costante la portata. Questa pompa non ha problemi di autonomia, è facile da pulire e permette di lavorare con una composizione variabile dell'eluente; tuttavia non consente di raggiungere pressioni molto elevate e richiede una periodica sostituzione della membrana di gomma, che tende a logorarsi.

3. Pompe reciprocanti a due pistoni: sono i dispositivi di pompaggio più versatili; comprendono due pistoni che lavorano in opposizione di fase: quando uno è in fase di aspirazione, l'altro è in fase di mandata:

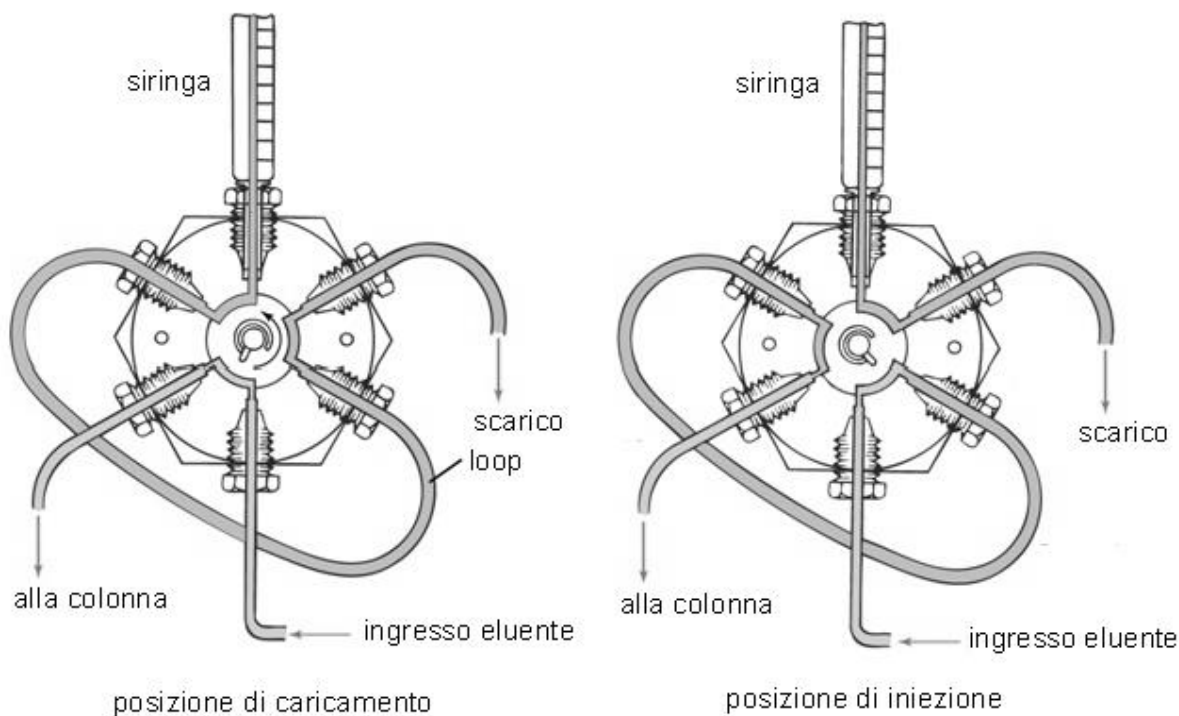


grazie al movimento dell'eccentrico, collegato all'albero motore, si ottengono due portate pulsanti che si compensano a vicenda e che vengono riunite all'uscita del sistema di pompaggio

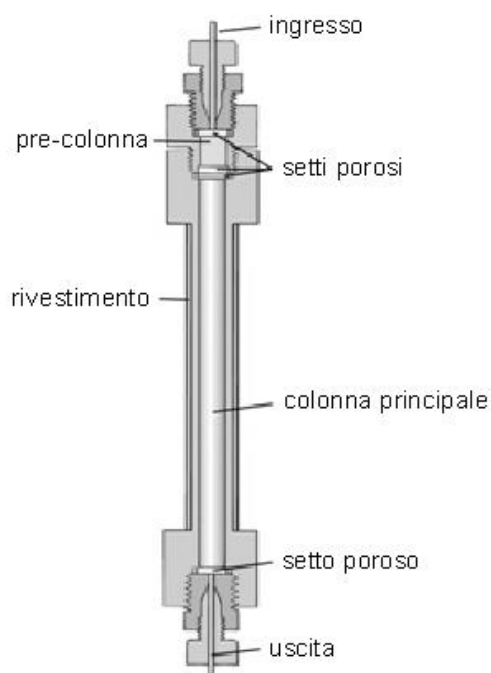
6.4. Iniettori

Ve ne sono di 2 tipi, a seconda della pressione di esercizio:

- iniettori per **colonne a bassa pressione** (<70 atm): sono simili a quelli per GLC; si utilizza una microsiringa che perforando una membrana di teflon deposita il campione nella camera di iniezione posta in testa alla colonna. Si utilizzano particolari microsiringhe, progettate per vincere le pressioni notevoli che si trovano all'interno del sistema cromatografico
- iniettori per **colonne ad alta pressione** (>70 atm): il campione viene iniettato in un sistema a valvola multidirezionale; inizialmente la valvola è posizionata per accogliere il campione in un capillare avvolto a serpentino (loop), dove viene depositato tramite una comune microsiringa; in seguito, ruotando una manopola, la valvola mette in comunicazione il loop con la colonna, dove il flusso di eluente trascina il campione



6.5. Colonne



I recenti sviluppi dell'HPLC sono dovuti soprattutto al perfezionamento delle colonne, che risulta l'elemento fondamentale per una corretta separazione cromatografica.

Si tratta di colonne di materiale plastico rivestito di acciaio o alluminio anodizzato, con diametro di 4-6 mm e lunghezza 20-25 cm (anche se gli ultimi tipi di colonna sono così efficienti da essere lunghe solo 3 cm!); all'interno due setti porosi trattengono il materiale solido di riempimento, molto fine (con una granulometria di 5-10 μm), ed eventualmente un liquido di ripartizione immobilizzato sulla fase solida, a seconda del tipo di cromatografia. Esistono anche colonne praticamente capillari, con diametri 0,1-0,2 mm.

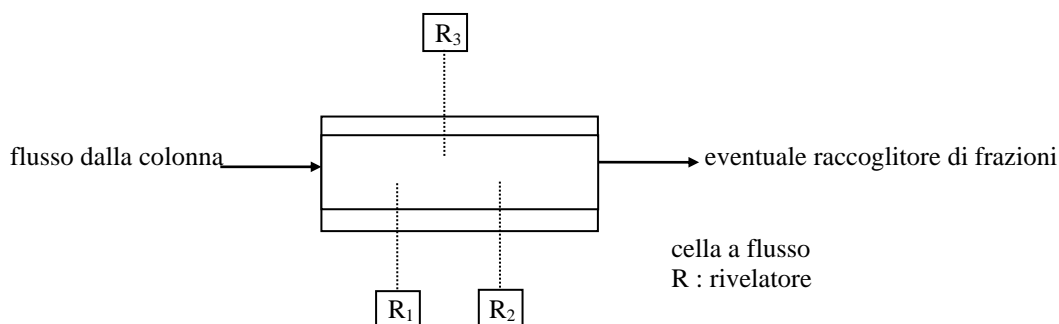
Anche le colonne per HPLC sono intercambiabili, in relazione al tipo di miscela analitica e sono commercializzate con una vasta gamma di riempimenti e di dimensioni.

Spesso vi è il rischio che sostanze inquinanti presenti nel campione o nell'eluente vengano trattenute irreversibilmente in colonna; per evitare questo fenomeno è presente una pre-colonna, posta a monte della colonna vera e propria, contenente lo stesso materiale di riempimento, che fissa gli inquinanti e prolunga la vita della colonna analitica; richiede ovviamente una sostituzione periodica.

6.6. Rivelatori

Il rivelatore ha il compito di fornire indicazioni sulla presenza e sulla quantità di ogni componente in uscita dalla colonna; di solito viene alloggiato in una cella speciale, detta **cella di flusso**, posta a valle della colonna, dove analizza in continuo una qualche proprietà del liquido uscente, confrontandola in continuo con la stessa proprietà dell'eluente puro; quando si ha una differenza significativa tra i due valori allora viene segnalata l'eluizione di un componente, indicata dal relativo picco nel cromatogramma.

Generalmente in un apparecchio per HPLC vi sono più rivelatori (3 o 4), ognuno specifico per una qualche proprietà chimico-fisica:

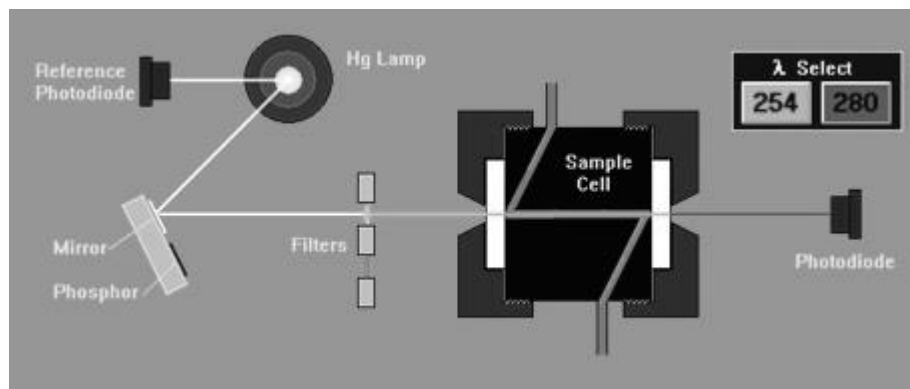


Vi sono vari tipi di rivelatori, perché non esiste un rivelatore universale, ma tutti devono soddisfare i seguenti requisiti, tipici dei rivelatori cromatografici: selettività, risposta, stabilità (deriva), limite di rivelabilità, rumore di fondo, linearità, sensibilità, già descritti nella GLC. Di solito un HPLC possiede più rivelatori ed i principali tipi sono:

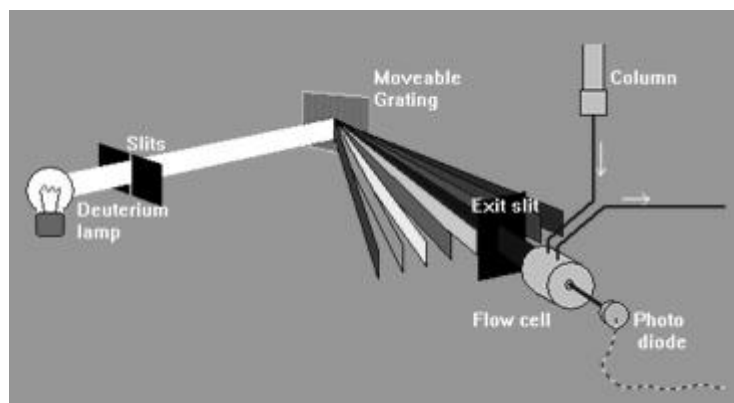
1. **Rivelatore spettrofotometrico UV-VS:** è molto usato in HPLC; di solito si analizzano sostanze organiche, dotate di gruppi cromofori (sistemi coniugati anelli aromatici, ecc.) in grado di assorbire in UV o nel VS; sono molto stabili ed hanno dei limiti di rivelabilità molto bassi (anche 100 pg). Vi sono rivelatori:

A lunghezza d'onda fissa: sono dotati di una lampada a vapori di Hg che produce due bande di emissione molto strette nell'UV a 254 nm e 280 nm; un successivo monocomatore a filtro isola la lunghezza d'onda analitica scelta, a cui assorbe la maggior parte degli analiti organici. La radiazione attraversa una cella a flusso a Z nella quale entra in continuo l'eluente, che non deve assorbire; l'assorbimento della radiazione, proporzionale alla concentrazione, si ha in corrispondenza dell'uscita dei diversi componenti del campione iniettato in colonna

Hanno il vantaggio di un basso costo ed elevata sensibilità, data l'intensità dell'emissione della lampada a Hg; lo svantaggio è la bassa selettività in quanto sono disponibili solo due lunghezze d'onda.

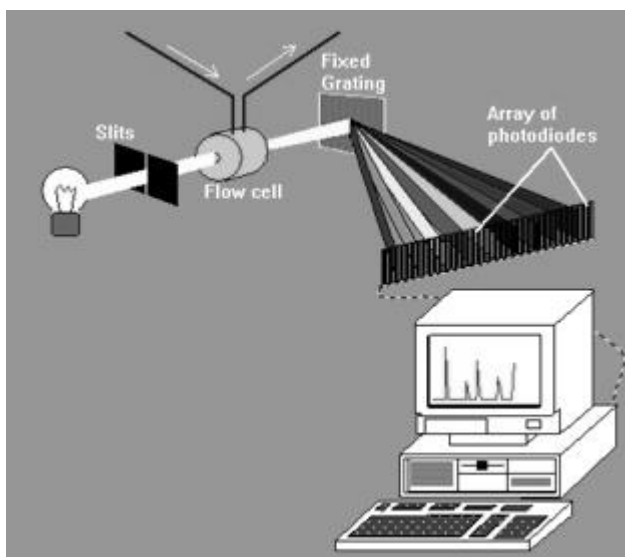


A lunghezza d'onda variabile: sono molto usati in HPLC. Una lampada a D₂ produce un intero spettro da 190 nm a circa 800 nm; la luce emessa viene scomposta nelle singole radiazioni da un reticolo a gradinata mobile e quindi una singola radiazione, tramite una fenditura di uscita, viene inviata in una cella a flusso dove entra in continuo l'eluente proveniente dalla colonna: l'uscita di ogni componente provoca l'assorbimento e la conseguente registrazione del picco cromatografico



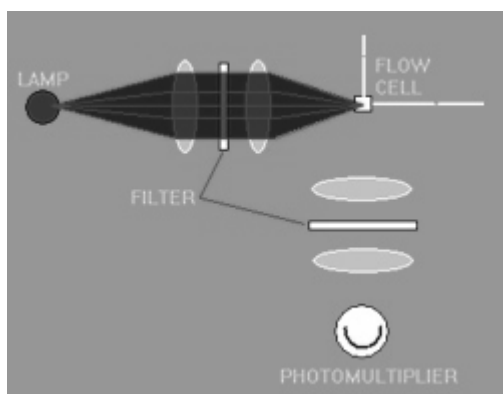
Si tratta di un rivelatore molto versatile, potendo selezionare una qualsiasi lunghezza d'onda tra 190 e 800 nm e quindi molto sensibile, potendo utilizzare la lunghezza d'onda più adatta (massima assorbanza) per ogni singolo analita. E' inoltre molto selettivo perché in caso di picchi sovrapposti si può variare la lunghezza d'onda analitica in modo da ridurre l'assorbimento degli interferenti. Infine è adatto a lavorare in gradiente di eluizione, potendo selezionare una λ alla quale la miscela eluente non assorba.

A schiera di diodi (DAD): attualmente si sta sempre più diffondendo in HPLC. La luce policromatica prodotta da una lampada a D₂ attraversa la cella a flusso e quindi viene scomposta da un reticolo a gradinata fisso; le radiazioni, separate angularmente dal reticolo, colpiscono un chip su cui sono incisi centinaia di fotodiodi, ognuno dei quali misura l'intensità di una singola lunghezza d'onda.



Un PC a cui è collegata la schiera di diodi registra in continuo gli interi spettri che vengono registrati in ogni istante durante il flusso dell'eluente. In questo modo ad ogni picco cromatografico viene associato uno spettro di assorbimento e ciò facilita molto l'individuazione qualitativa dei diversi componenti della miscela analizzata. Impostando una singola lunghezza d'onda analitica per ogni sostanza è ovviamente possibile effettuare anche l'analisi quantitativa dopo calibrazione preliminare. E' più costoso del precedente ma ha gli stessi vantaggi ed in più permette di effettuare l'analisi qualitativa con grande rapidità e facilità.

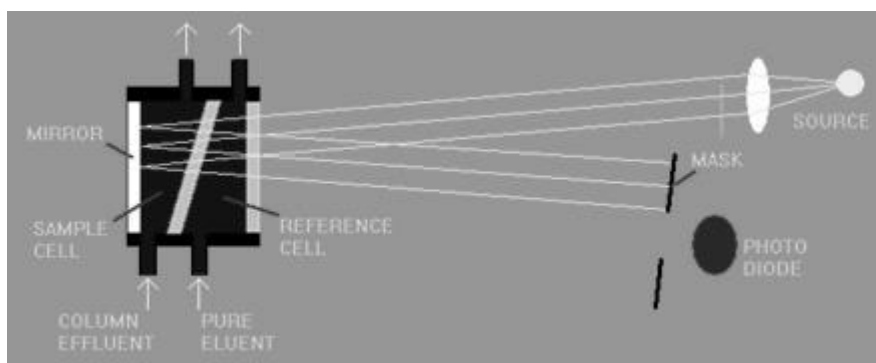
2. **Rivelatore a fluorescenza:** il liquido uscente dalla colonna attraversa la cella di flusso dove viene investito da una radiazione UV prodotta da una lampada al Hg o allo Xe; la radiazione incidente (di solito intorno a 360 nm) produce l'eccitazione e la conseguente emissione per fluorescenza da parte di molte sostanze organiche. L'intensità della luce emessa viene analizzata ortogonalmente alla cella di flusso da un normale fotomoltiplicatore e costituisce il segnale analitico..



Il rivelatore a fluorescenza è molto sensibile (fino a concentrazioni di 10^{-10} g/ml), molto selettivo, insensibile agli sbalzi termici ed alle variazioni del flusso di eluente ma è limitato a poche sostanze fluorescenti. Per ampliarne il campo di azione è possibile far reagire gli analiti con appositi marcatori (marker) fluorescenti che si legano in modo covalente, con un trattamento preliminare all'analisi vera e propria detto derivatizzazione. E' un rivelatore molto usato per analisi in campo biologico (vitamine, ecc.) anche in gradiente di eluizione

3. **Rivelatore rifrattometrico:** misura in continuo l'indice di rifrazione del liquido uscente dalla colonna; si tratta di un rivelatore quasi universale perché in pratica qualsiasi sostanza ha un indice di rifrazione diverso da quello dell'eluente. In particolare viene utilizzato per sostanze che non assorbono in UV (idrocarburi saturi, alcoli, eteri, ecc.). In questo caso è necessario usare eluenti con un basso indice di rifrazione ed occorre fare attenzione che non si formino bollicine nella cella di flusso. Il rivelatore misura la differenza di indice di rifrazione tra una cella di riferimento, in cui passa solo l'eluente puro, ed una cella a flusso in cui passa l'eluente in uscita dalla colonna. Quando tra le due celle non vi è differenza il fascio di luce prodotto dalla sorgente non colpisce il fotodiode e quindi non produce segnale; quando nella cella del campione esce un analita, varia l'indice di rifrazione e quindi i raggi riflessi

dallo specchio cambiano angolo ed arrivano al fotodiodo che produce il segnale corrispondente al picco cromatografico.



E' un rivelatore molto versatile con una buona sensibilità ma non è adatto lavorando in gradiente di eluizione; è inoltre sensibile a variazioni di temperatura e di pressione.

4. **Rivelatore conduttimetrico:** la misura della conducibilità del liquido uscente dalla colonna permette di rivelare l'eluizione di sostanze ioniche o di specie con polarità nettamente diversa da quella del solvente (per es. gli amminoacidi). E' un rivelatore sensibile alla temperatura che non consente di lavorare in gradiente di eluizione; ha una buona sensibilità, fino a 10^{-8} g/ml

6.7. La fase fissa

Il riempimento di una colonna per HPLC può essere di due tipi:

- a) pellicolare: si tratta di granuli di circa $50\mu\text{m}$ con porosità limitata alla zona superficiale, in modo da rendere più rapidi gli scambi di materia tra le due fasi; si realizzano in tal modo delle superfici specifiche di circa $50\text{ m}^2/\text{g}$ di solido
- b) poroso: si tratta di granuli di $5\text{-}10\ \mu\text{m}$ con porosità estesa a tutto il granulo; in tal caso la superficie specifica arriva a circa $500\text{ m}^2/\text{g}$ di solido e quindi migliora nettamente l'efficienza della colonna; è oggi il riempimento più usato.

I solidi impiegati in HPLC hanno diversa natura chimica in relazione al tipo di cromatografia da realizzare:

1. Adsorbimento: si usa gel di silice o allumina che, essendo polari, trattengono per tempi maggiori gli analiti maggiormente polari
2. Ripartizione: si utilizzano liquidi ad alto peso molecolare immobilizzati su un solido inerte, generalmente silice; per evitare il trasporto del liquido di ripartizione spesso si lega chimicamente lo stesso al solido: in questo caso si parla di fasi legate

6.8. La fase mobile

L'eluente (o solvente) deve trascinare i diversi componenti lungo la colonna, dove si separano per effetto della competizione tra le due fasi, mobile e stazionaria. L'eluente deve possedere particolari **caratteristiche**:

- deve avere un adeguato potere solvente nei confronti degli analiti
- deve avere un'elevata purezza poiché spesso si analizzano sostanze in tracce
- deve essere compatibile col rivelatore (per esempio non deve dare massimi di assorbimento in UV utilizzando un rivelatore spettrofotometrico).

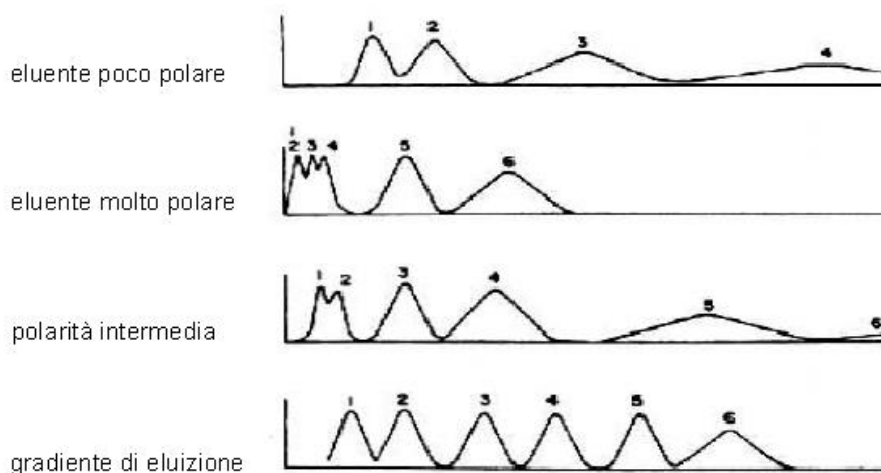
Di solito viene utilizzata **una miscela binaria di eluenti**, uno ad alta polarità, l'altro a bassa polarità: in tal modo, la % dei due eluenti determina la polarità complessiva del solvente; ad esempio una miscela molto usata è quella acqua-metanolo.

Normalmente l'HPLC utilizza una fase stazionaria polare ed una fase mobile tendenzialmente apolare (cromatografia normale o NPC): gli analiti maggiormente polari vengono trattenuti maggiormente e quindi presentano maggiori tempi di eluizione. Si può anche realizzare una situazione opposta, con una fase stazionaria apolare ed una fase mobile polare, con polarità variabile a seconda della sua composizione (cromatografia in fase inversa o RPC): in questo caso l'ordine di eluizione è opposto.

L'eluizione in HPLC può essere realizzata in due modi diversi:

1. Separazione isocratica: la composizione dell'eluente rimane costante per tutto lo sviluppo del cromatogramma

2. Gradiente di eluizione: si varia con continuità la composizione (e quindi la polarità, cioè il potere solvente, dell'eluente), mediante opportuni dispositivi di miscelazione di diversi eluenti, uno poco polare e l'altro ad elevata polarità. Di solito si inizia con una miscela eluente con bassa polarità (basso potere solvente): in tal modo si ritarda l'uscita dei componenti più solubili, che altrimenti non si separerebbero adeguatamente; successivamente si aumenta la quantità di solvente polare nella miscela di eluizione: aumenta la polarità e quindi il potere solvente, pertanto si favorisce l'uscita anche dei componenti meno solubili, che richiederebbero tempi molto lunghi e che darebbero picchi molto allargati. Questa tecnica, che è analoga alla programmazione della temperatura in GLC, consente di risolvere un gran numero di problemi analitici, una volta individuata l'adatta coppia di solventi, come si vede nel disegno seguente, dove vengono confrontate diverse situazioni:



6.9. Tecniche analitiche in HPLC

Dopo aver scelto la colonna più adatta, si allaccia al resto dell'apparecchio e quindi si procede al condizionamento, facendo passare nella colonna, per un tempo opportuno, l'eluente puro. Successivamente si procede ad una serie di controlli, che variano in relazione al tipo di apparecchio, per verificare il corretto funzionamento della colonna e dei rivelatori. Si procede quindi all'iniezione del campione ed allo sviluppo del cromatogramma.

Le metodiche di analisi sono analoghe alla GLC:

- analisi qualitativa: viene realizzata facendo riferimento al tempo di ritenzione
- analisi quantitativa: l'area del picco è proporzionale alla concentrazione dell'analita; si possono impiegare quelle tecniche analitiche già descritte nella GLC, come: normalizzazione interna, standardizzazione interna ed esterna.

6.10. Applicazioni dell'HPLC

Sono numerosissime e sono in continuo aumento. Le applicazioni sono le stesse della gascromatografia ma con il grande vantaggio di essere utilizzate per qualsiasi miscela liquida, anche con sostanze termodegradabili, visto che non è necessaria la vaporizzazione del campione:

- analisi degli additivi alimentari in tracce (conservanti, ecc.)
- analisi dei residui di pesticidi (frutta, verdura, ecc.)
- analisi cliniche (tracce di farmaci e metaboliti in campioni biologici)
- analisi di tossine (per es. nei casi di intossicazione alimentare)