

GasCromatografia

In **gascromatografia** (*Gas Chromatography, GC*), la fase mobile è un gas permanente (detto **carrier** o **gas di trasporto**) che fluisce attraverso una colonna in cui è posta la fase stazionaria

All'uscita della colonna un **rivelatore** segnala il passaggio dei diversi componenti della miscela a un sistema di elaborazione dei segnali

Quest'ultimo fornisce il **gascromatogramma**, in cui la quantità di sostanza eluita è diagrammata in funzione del tempo che la sostanza ha impiegato per attraversare la colonna.

I meccanismi di separazione e le prestazioni dipendono da:

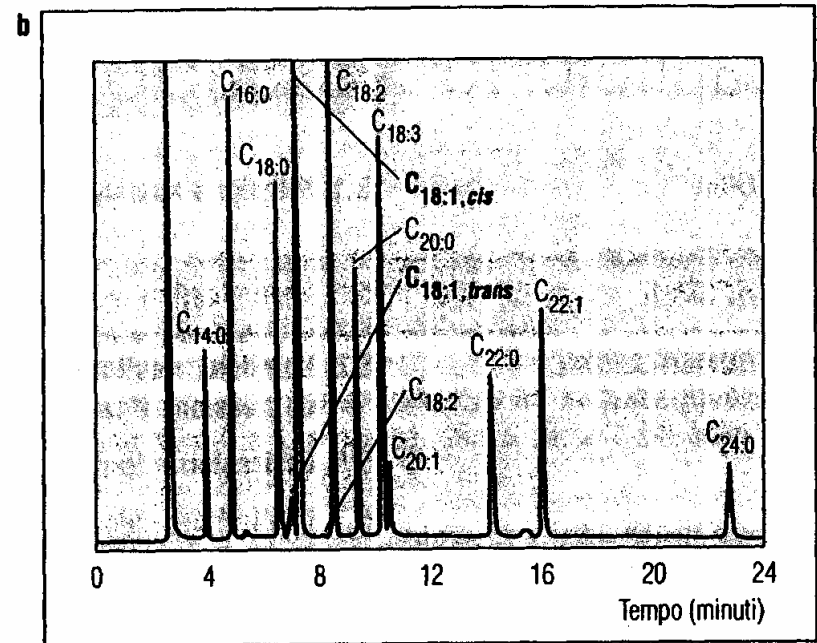
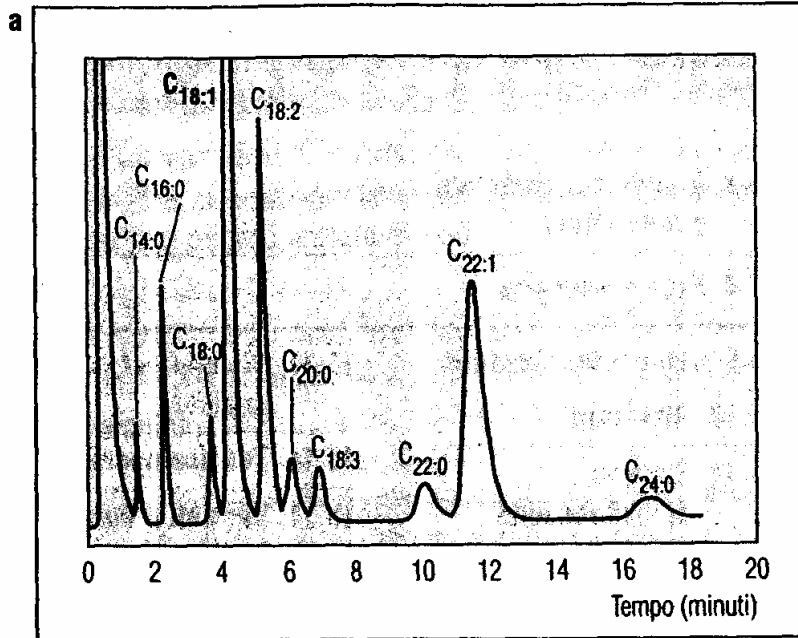
- caratteristiche chimico-fisiche della fase stazionaria
- forma con cui questa è presente nella colonna

Con questa tecnica è possibile analizzare campioni gassosi, liquidi o solidi, purché siano opportunamente solubilizzati e possano essere vaporizzati.

Questa condizione, in effetti, è la vera limitazione della GC, che in molti casi è stata superata dalla HPLC

La figura mostra la separazione di esteri metilici di acidi grassi condotta con due tipiche varianti gascromatografiche:

su colonna impaccata e su colonna capillare.



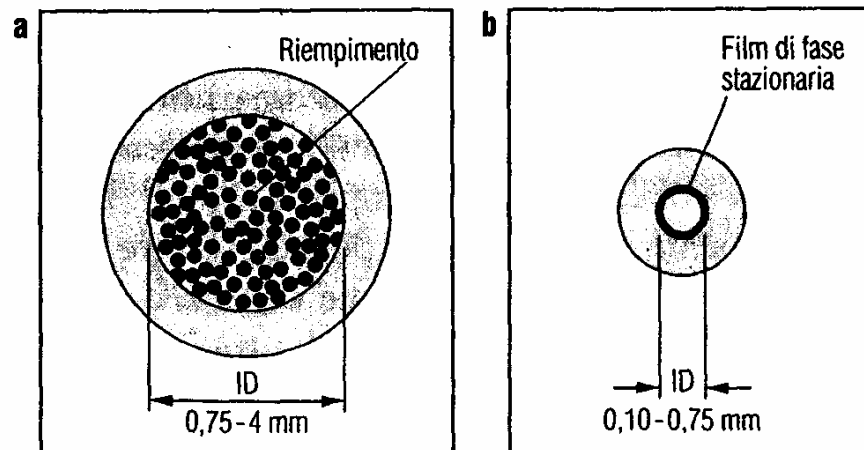
CLASSIFICAZIONE DELLE TECNICHE GASCROMATOGRAFICHE

In riferimento allo **stato fisico** della fase stazionaria:

- **cromatografia gas-solido** (*Gas Solid Chromatography, GSC*);
- **cromatografia gas-liquido** (*Gas Liquid Chromatography, GLC*).

In riferimento alle **caratteristiche geometriche** della colonna e la collocazione della fase stazionaria in quest'ultima:

- GC su **colonne impaccate**
- GC su **colonne capillari**



Secondo il modo in cui si presenta la fase stazionaria, le colonne capillari si distinguono in:

- a. colonne capillari **aperte** (*Wall Coated Open Tubular, WCOT*), in cui le pareti sono ricoperte (o legate chimicamente) dalla fase stazionaria liquida;
- b. colonne capillari **aperte con rivestimento supportato** (*Support Coated Open Tubular, SCOT*), in cui un materiale granulare poroso molto fine, su cui è stato depositato un sottilissimo film di liquido di ripartizione, viene fatto aderire alle pareti della colonna;
- 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 alle pareti.

GRANDEZZE, PARAMETRI E PRESTAZIONI

- selettività;
- efficienza;
- risoluzione;
- tempi di lavoro;
- asimmetria dei picchi;
- capacità.

Questi fattori, a loro volta, si correlano ai tempi (volumi) di ritenzione e ad altre grandezze fondamentali nel processo cromatografico.

TEMPO E VOLUME DI RITENZIONE

$$t'_R = t_R - t_M$$

$$V'_R = V_R - V_M$$

$$V_R = t_R F_C$$

$$V'_R = t'_R F_C$$

Tuttavia, per quanto riguarda la misura dei volumi, si devono fare almeno due precisazioni.

1. In GC il flusso della fase mobile viene misurato a temperatura ambiente con un flussimetro a bolle di sapone posto all'uscita della colonna. L'uso di questi dispositivi può causare errori non trascurabili perché i flussi sono molto bassi e difficili da misurare. In questi casi si calcola la **velocità lineare media** di un composto iniettato in colonna e non trattenuto da essa.

2. In GC il volume di ritenzione corretto (V'_R) non esprime l'effettivo volume di ritenzione di una determinata sostanza perché **i gas sono comprimibili**. Di conseguenza, si deve introdurre nelle precedenti equazioni un fattore di correzione, detto **fattore di compressibilità** (j), che compensi la caduta di pressione fra l'entrata (p_i) e l'uscita (p_u) della colonna.

$$V_N = V'_R j$$

Dove:
$$j = \frac{3}{2} \frac{(p_i/p_u)^2 - 1}{(p_i/p_u)^3 - 1}$$

Il tempo di ritenzione, e quindi anche V_N dipende anche dalla quantità di fase stazionaria presente in colonna. Quindi per confrontare il comportamento di colonne diverse, ma con lo stesso riempimento, si definisce il **volume di ritenzione specifico** (V_g):

$$V_g = \frac{V_N}{m_s} \frac{273}{T_c}$$

Dove: m_s = massa FS in g
 T_c temperatura colonna in K

Il volume di ritenzione specifico, dunque, non è altro che il volume di ritenzione per grammo di fase stazionaria riferito alla temperatura di 0 °C (tramite il fattore 273/ T_c).

Per calcolare V_g si applica la seguente relazione, che può essere facilmente ottenuta dalle precedenti:

$$V_g = \frac{3}{2} \frac{V_R [(p_i/p_u)^2 - 1]}{m_s [(p_i/p_u)^3 - 1]} \frac{273}{T_c}$$

In questa equazione, V_g , p_i e p_u sono parametri sperimentali (noti); V_R può essere ricavato dal cromatogramma.

COSTANTE DI DISTRIBUZIONE, FATTORE DI RITENZIONE E RAPPORTO DI FASE

La costante di distribuzione (K_c) e il fattore di ritenzione (k) dipendono sensibilmente dalla **temperatura**, che gioca un ruolo determinante in GC

Quando aumenta la temperatura diminuiscono:

C_s/C_m (ovvero K_c)

n_s/n_m (ovvero k)

t_R .

I due parametri K_c e k sono legati fra loro dalle seguenti relazioni:

$$K_c = \frac{V_M}{V_S} k$$

$$K_c = \beta k$$

$$\beta = \frac{V_G}{V_L}$$

$$\beta = \frac{V_G}{V_L}$$

Le colonne capillari hanno un rapporto di fase maggiore di quelle impaccate

Valore approssimato di β per colonne GC

Colonna	β
Impaccata	10-20
SCOT	40-70 (0.5 mm ID)
WCOT	100-150 (0.25 mm ID)

Nel caso di colonne capillari è relativamente facile far variare β , agendo sul diametro della colonna e sullo spessore del film oppure, in alternativa, aumentando la superficie interna su cui è depositato il liquido e, contemporaneamente, diminuendo lo spessore del film di liquido.

SELETTIVITÀ

La selettività, definita come capacità del sistema cromatografico di eluire due sostanze in tempi diversi, è espressa dal fattore di separazione (α):

$$\alpha = \frac{t'_{R2}}{t'_{R1}} = \frac{k_2}{k_1} = \frac{K_{C2}}{K_{C1}}$$

Dipende solo dalla temperatura e dal tipo di fase stazionaria (perché i gas, in linea di massima, sono inerti).

EFFICIENZA

Capacità di un sistema cromatografico di eluire una data sostanza in una banda stretta

Le maggiori differenze fra colonne impaccate e capillari aperte si riscontrano solo relativamente all'efficienza «complessiva».

colonna impaccata 2 m :N= 4000 (fino a non più di 7000-8000)

colonne capillari 100-150 m: N=50000-150000 (e anche fino a 700000).

Questa vistosa differenza dipende sostanzialmente da due fattori, che hanno un peso molto diverso.

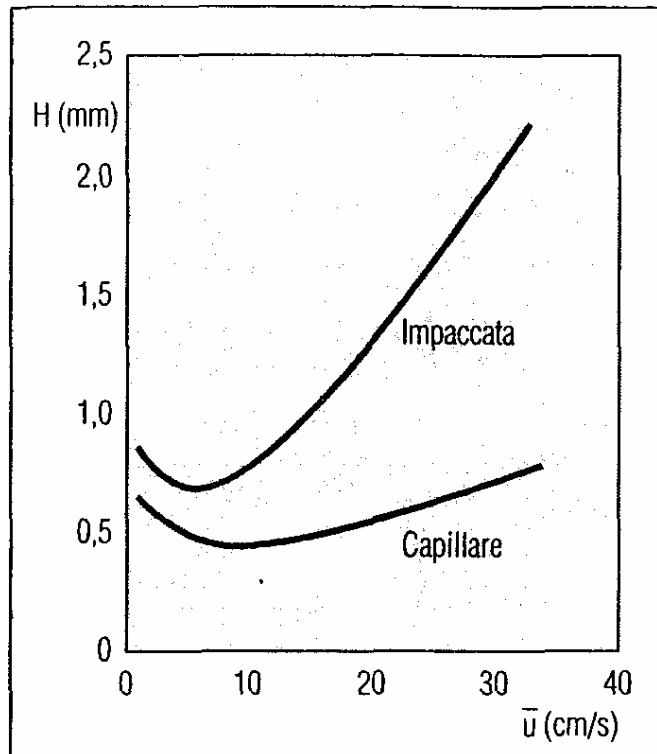
1. La **permeabilità (B_0)** nettamente superiore nelle colonne capillari

2. Per quanto riguarda **l'altezza equivalente al piatto teorico (H)**, a parità di fase stazionaria le differenze fra colonne capillari e impaccate sono essenzialmente tre:

- le colonne capillari hanno sempre un valore di H minore rispetto a quello di colonne impaccate;
- il valore di H_{\min} non differisce in modo significativo nei due tipi di colonne;
- nelle colonne capillari, H varia molto poco al variare del flusso (o della velocità lineare) del *carrier*

Ne deriva che:

- a parità di lunghezza, le colonne capillari sono di poco più efficienti di quelle impaccate;
- l'efficienza delle colonne capillari si mantiene quasi inalterata se si aumenta il flusso di *carrier* per diminuire i tempi di lavoro.



Le ragioni di queste differenze possono essere dedotte in base al modello proposto da Van Deemter e Golay.

Colonne tradizionali impaccate

L'equazione di Van Deemter, nella forma completa è:

$$H = A + \frac{B}{\bar{u}} + C\bar{u} \quad C = C_S + C_M$$

$$H = 2\lambda d_p + \frac{2\gamma D_G}{\bar{u}} + \left(\frac{qkd_f^2}{(1+k)^2 D_L} + \frac{\omega d_p^2}{D_G} \right) \bar{u}$$

In GC tradizionale, poichè D_G ha un valore elevato, il terzo membro dell'equazione si semplifica:

$$H = 2\lambda d_p + \frac{2\gamma D_G}{\bar{u}} + \frac{qkd_f^2}{(1+k)^2 D_L} \bar{u} \quad H = A + \frac{B}{\bar{u}} + C_S \bar{u}$$

Colonne capillari aperte

I fenomeni dovuti ai percorsi multipli nella fase stazionaria sono assenti, quindi l'equazione di Van Deemter assume la forma:

$$H = \frac{B}{\bar{u}} + (C_S + C_G)\bar{u}$$

$$H = \frac{2\gamma D_G}{\bar{u}} + \left(\frac{qkd_f^2}{3(1+k)^2 D_L} + \frac{(1+6k+11k^2)r^2}{24(1+4k)^2 D_G} \right) \bar{u}$$

equazione di Golay

Ottimizzazione dell'efficienza

Lunghezza delle colonne

Diametro delle particelle

Liquido di ripartizione

- Poco viscoso
- Bassa tensione di vapore
- Buon solvente della miscela da separare
- Altamente selettivo verso le sostanze che la compongono

Per le colonne impaccate, si usano percentuali di fase stazionaria (rispetto al supporto) piuttosto basse, in genere intorno al 3-10%

Temperatura

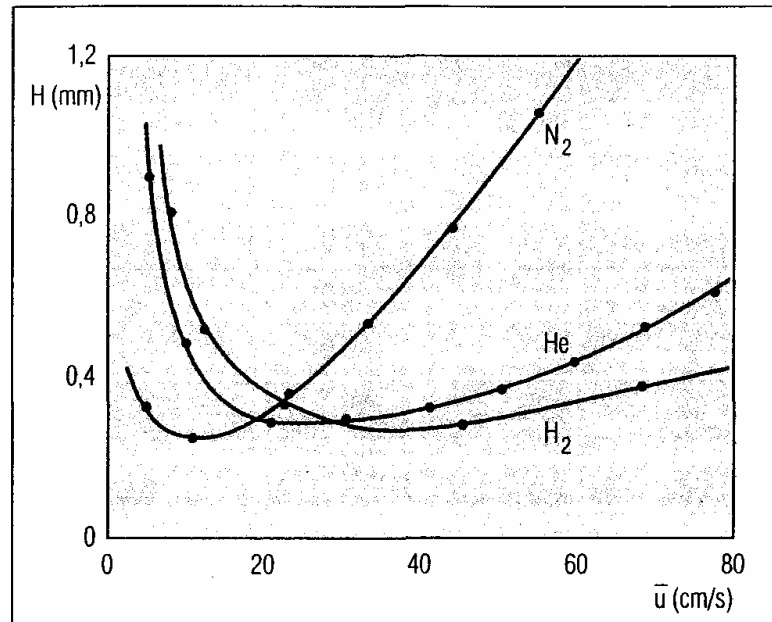
$$H = a + \frac{b}{T} + cT$$

Il valore ottimale corrisponde circa alla temperatura ambiente

Diametro interno della colonna

Se si riduce il diametro interno della colonna, l'efficienza migliora sia per le colonne impaccate (diminuiscono λ e ω) sia per le colonne capillari (diminuisce r).

Carrier L'efficienza migliora leggermente al crescere della massa molare del gas



Flusso (o velocità lineare).

RISOLUZIONE

$$R_S = \frac{t_{R2} - t_{R1}}{\frac{w_{b1} + w_{b2}}{2}}$$

$$R_S = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{w_{b1} + w_{b2}}$$

$$R_S = \frac{1}{4} \sqrt{N} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k_2}{1 - k_2} \right)$$

N nelle colonne capillari è così grande da dare un contributo fondamentale

Inoltre, le colonne capillari consentono di lavorare a temperature leggermente inferiori rispetto alle colonne impaccate, il che comporta maggiori valori di α e quindi migliore risoluzione.

Infine è opportuno che k sia il più elevato possibile

Le colonne impaccate hanno un fattore di ritenzione maggiore rispetto alle colonne capillari e pertanto, sotto questo profilo (ma solo questo), una risoluzione migliore.

Un aumento di temperatura comporta una sensibile diminuzione di k , e quindi una diminuzione (anche se di poche unità percentuali) della risoluzione.

Un aumento di pressione (e il conseguente aumento del flusso) provoca una leggera diminuzione della risoluzione, perché diminuisce N .

Uno degli accorgimenti più usati in *GC* è quello di programmare la temperatura e la pressione

TEMPI DI LAVORO

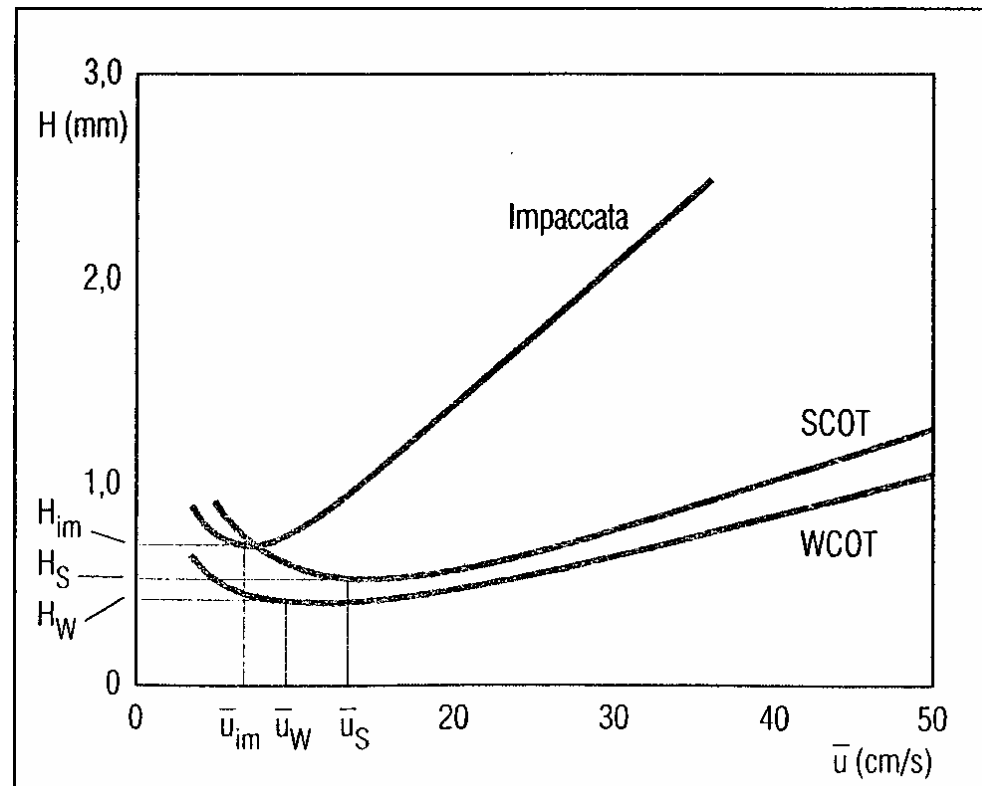
$$t_R = 16R_S^2 \left(\frac{\alpha}{\alpha-1} \right)^2 \frac{(1-k)^3}{k^2} \frac{H}{\bar{u}}$$

Le condizioni ottimali per minimizzare il valore di t_R si ottengono:

- per piccoli valori di R_S , compresi fra 1 e 5;
- per valori di α relativamente grandi;
- per valori di k che idealmente si avvicinano a 2;
- per valori di u relativamente grandi, in modo da rendere minimo il termine H/u .

Le differenze fra colonne impaccate e capillari sono notevoli data la grande efficienza delle colonne capillari, la loro risoluzione si mantiene soddisfacente anche se la selettività è bassa. Invece, con le colonne impaccate la selettività deve essere necessariamente alta; questo, però, si ottiene solo abbassando la temperatura, con un aumento non trascurabile dei tempi di lavoro

Quanto alla velocità del *carrier* (u), il termine C dell'equazione di Golay (per colonne capillari) è minore dell'omologo termine della Van Deemter (per colonne impaccate), per cui si possono usare, per le colonne capillari, flussi più elevati senza compromettere l'efficienza. La figura 1.5.5 mostra la funzione H/u per una tipica colonna impaccata e per i due tipi principali di colonne capillari (WCOT e SCOT).

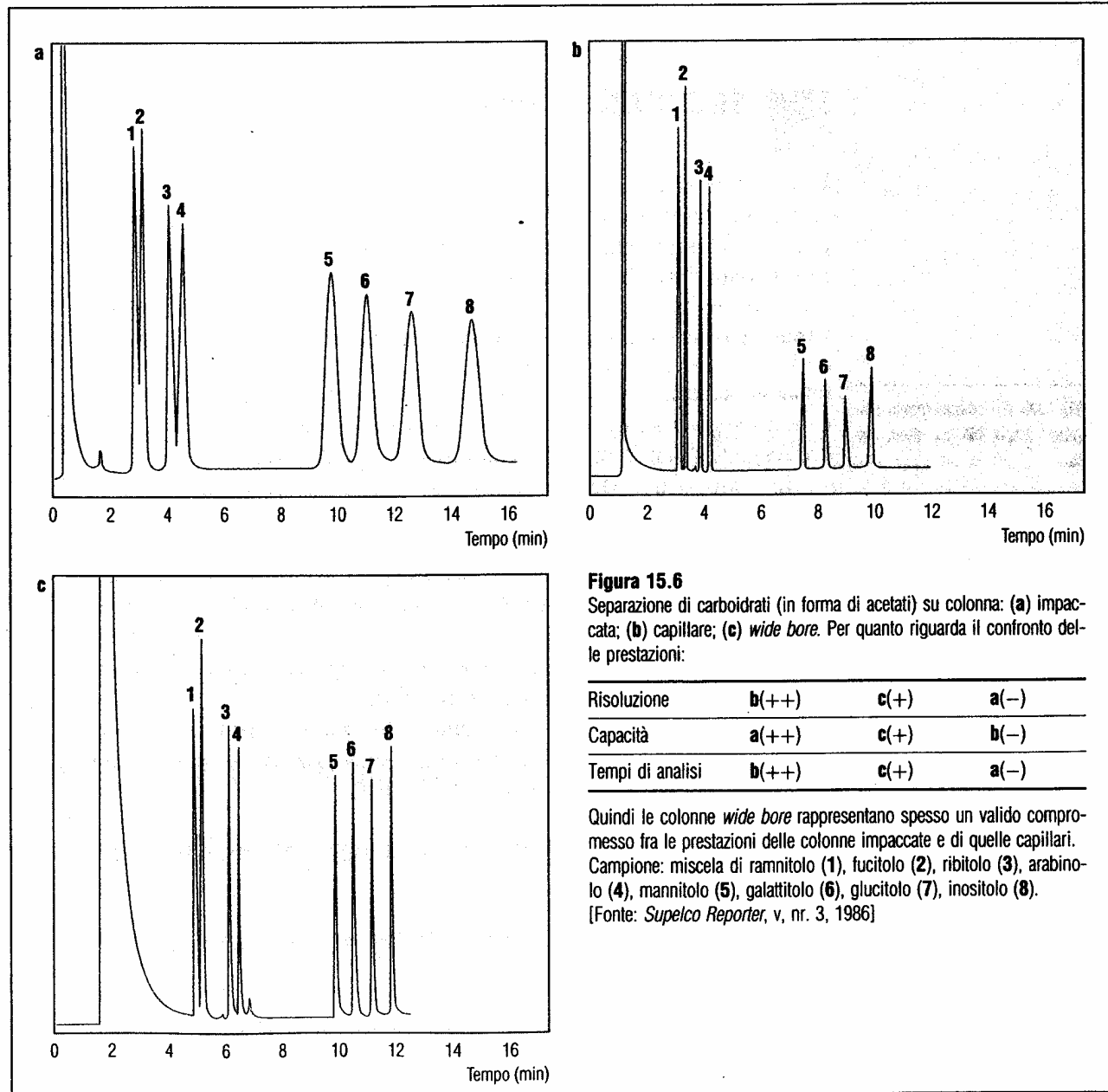


ASIMMETRIA DEI PICCHI E CAPACITA'

Le cause più probabili di asimmetria sono:

- **introduzione scorretta** del campione;
- particolari **caratteristiche chimico-fisiche** della fase stazionaria;
- **sovrassaturazione** della fase stazionaria.

Le colonne impaccate hanno una capacità molto maggiore rispetto alle colonne capillari, perché maggiore è la quantità di fase stazionaria che le riempie.



FASE MOBILE

Criteri per la scelta del carrier:

Costo

Grado di purezza

- la presenza di **acqua** può provocare la parziale o completa distruzione della fase stazionaria o anche causare problemi al rivelatore (soprattutto a bassa temperatura);
- l'**ossigeno** può provocare processi ossidativi della fase stazionaria o danni al rivelatore;
- gli **idrocarburi** possono provocare problemi se si usa un rivelatore FID perché fanno innalzare la linea di base del segnale.

Inerzia chimica

Densità e viscosità

Compatibilità con il rivelatore

E' determinante che il gas di trasporto, oltre ad essere esente da impurezze, non venga segnalato dal rivelatore.

I gas più usati, fra i pochi che rispondono a questi requisiti, sono:

- idrogeno;
- elio e miscele elio/idrogeno;
- azoto;
- argon;
- diossido di carbonio.

FASE STAZIONARIA

Nella cromatografia gas-solido, il meccanismo di separazione è quello dell'adsorbimento.

I materiali sono gli stessi per le colonne impaccate e per le capillari PLOT.

I materiali più usati sono:

- gel di silice;
- allumina;
- carbone attivo;
- setacci molecolari;
- zeoliti;
- sali inorganici.

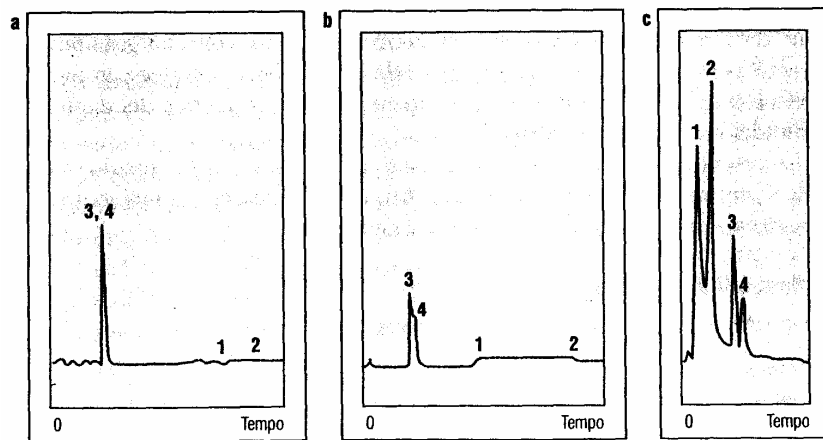
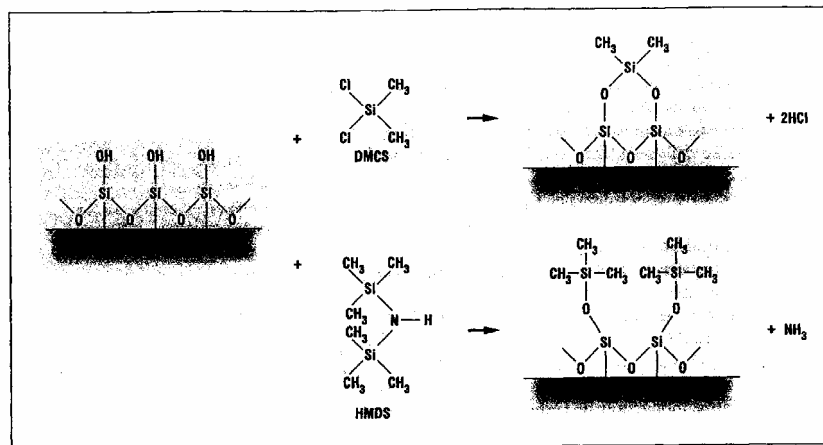
FASI STAZIONARIE LIQUIDE PER GLC

La fase stazionaria liquida viene ancorata a un supporto solido inerte che deve avere i seguenti requisiti:

- inerzia chimica;
- resistenza meccanica e termica;
- buon grado di «bagnabilità» da parte del liquido di ripartizione;
- bassa resistenza al flusso del gas;
- disponibilità sotto forma di particelle il più possibile sferiche.

Materiali di supporto

- Terra di diatomee;
- Teflon;
- Microsfere di vetro.



Effetto del trattamento del supporto (Chromosorb P) sulla risoluzione di una stessa miscela: (a) nessun trattamento; (b) lavaggio acido; (c) lavaggio acido e sililazione con dimetilclorosilano DMCS. Campione: miscela di etanolo (1), metiletilchetone (2), benzene (3), cicloesano (4).

Liquidi di ripartizione

Requisiti:

- **bassa tensione di vapore** nelle condizioni di lavoro (0,01-0,1 mmHg);
- **elevata stabilità termica**;
- **elevata inerzia chimica** per i componenti della miscela, per il supporto e anche per il materiale di cui è costituita la colonna;
- **buon effetto solvente** sulla miscela;
- **bassa viscosità** alle temperature di esercizio.

Criteri di classificazione più usati

Natura chimica delle sostanze usate come fase stazionaria

Classificazione dei diversi materiali secondo la **polarità**

Prima classe: apolari (idrocarburi o siliconi con sostituenti non polari)

Seconda classe: a bassa polarità (esteri di alcoli di grande massa molare)

Terza classe: polari (poliglicoli, polialcoli e i loro esteri)

Quarta classe: molto polari (glicoli, glicerina, idrossiacidi)

FASI STAZIONARIE LEGATE

Per evitare la perdita di fase stazionaria, la si può « legare » chimicamente ai gruppi ossidrilici della silice del supporto o alle pareti della colonna. Si ottiene così una **fase stazionaria legata**, che presenta uno spurgo (bleeding) molto più modesto

Vantaggi:

Termicamente stabile

Possibilità di lavaggio con solventi

Maggiore riproducibilità

Sono anche disponibili delle **fasi stabilizzate**, che non possono essere lavate con solventi, ma che, grazie a opportuni trattamenti termici, hanno una stabilità termica maggiore rispetto alle tradizionali fasi non legate.

CRITERI PER LA SCELTA DELLA FASE STAZIONARIA E DEL TIPO DI COLONNA

1. Per i **gas** permanenti e gli **idrocarburi bassobollenti** (C_1-C_{10}) è consigliabile usare **fasi stazionarie solide**.
2. Per le miscele di composti con **polarità simile**, ma con punti di ebollizione abbastanza diversi, non è necessario che la fase stazionaria sia molto selettiva, per cui se ne usa una **apolare**. In questo modo, i composti più volatili vengono eluiti per primi.
3. Per miscele di composti con **polarità molto diverse**, ma con punti di ebollizione molto simili, si possono usare fasi stazionarie **sia polari che apolari**. Con quelle polari, i componenti più polari sono trattenuti di più, perché più affini alla fase stazionaria. Con quelle apolari, invece, le sostanze polari sono trattenute meno, perché sono rese più volatili dalla repulsione da parte della fase stazionaria.
4. Per miscele contenenti sia **sostanze non polari sia sostanze polarizzabili** (come per esempio *n-esano* e benzene), si usano **fasi molto polari**, che polarizzano gli aromatici stabilendo legami di tipo dipolo-dipolo indotto, mentre trattengono poco i composti apolari.

Le **colonne impaccate**, che hanno maggiore capacità, devono essere usate per le analisi in cui non occorra (o addirittura si debba evitare di) isolare un gran numero di componenti dalla miscela, perché interessano solo quelli principali. Sono necessario anche in GC preparativa, cioè quando si devono sottoporre a ulteriori analisi le sostanze eluite dalla colonna.

Le **colonne capillari**, che hanno sensibilità ed efficienza elevate, consentono di spingere a fondo la separazione del maggior numero possibile di componenti della miscela.

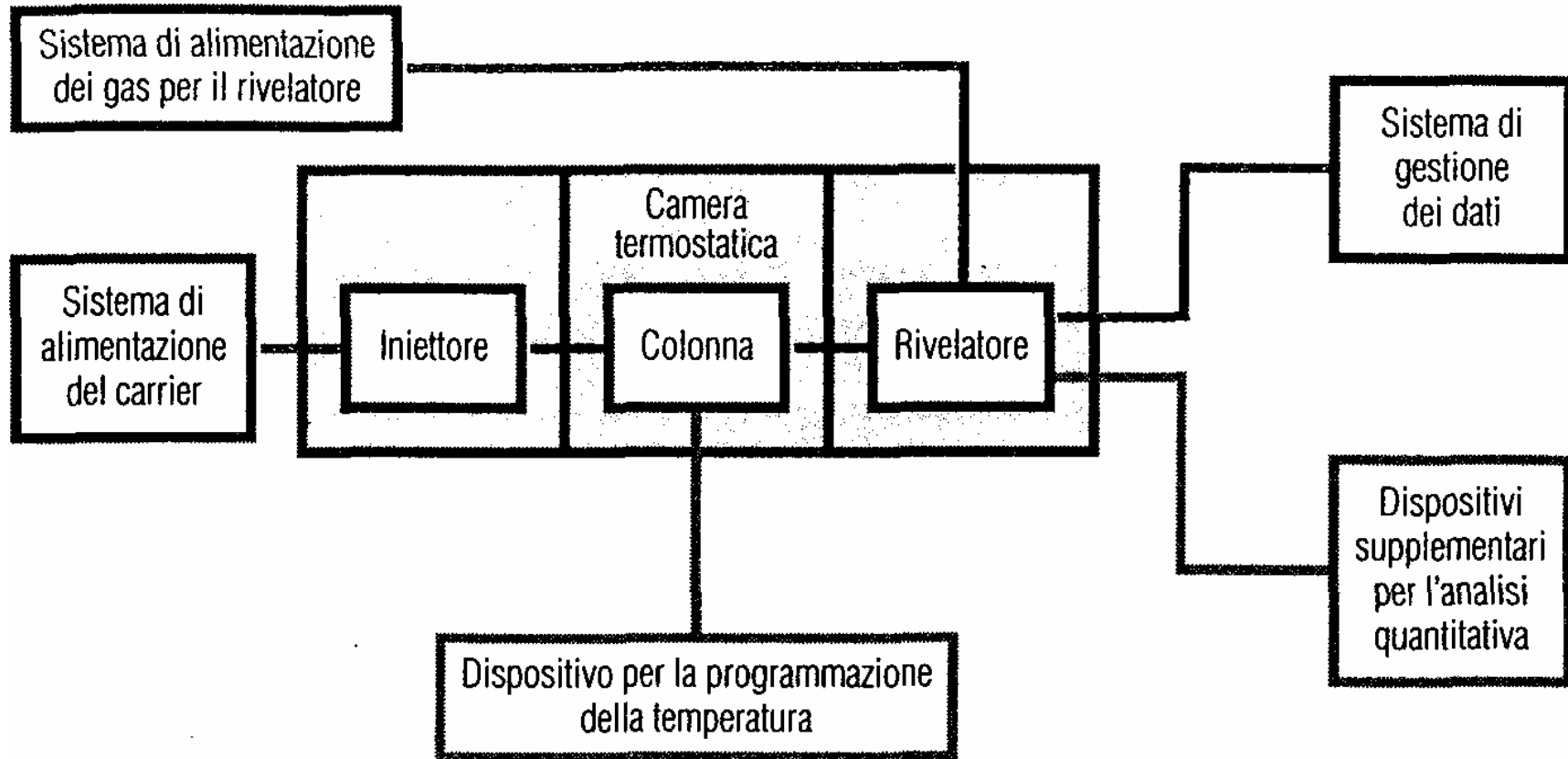
Scelta di colonne impaccate

- a. tipo di fase stazionaria;
- b. eventuale supporto e relativa granulometria;
- c. trattamento chimico-fisico subito dal supporto;
- d. percentuale di rivestimento (se la fase stazionaria è liquida).
- e. materiale della colonna;
- f. dimensioni della colonna;
- g. configurazione della colonna (a spirale, a U o a W);
- h. temperatura massima sopportabile dalla fase stazionaria.

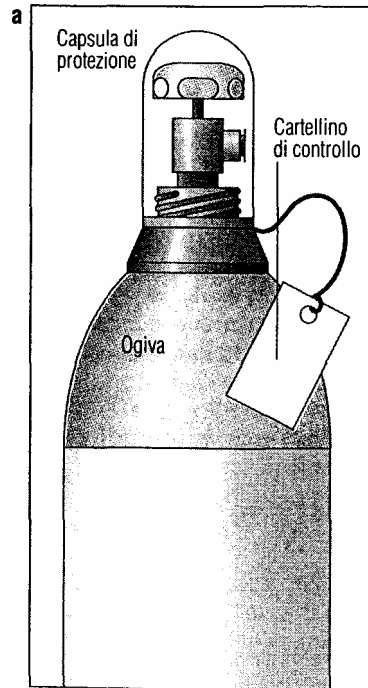
Scelta di colonne capillari

- a. lunghezza;
- b. id;
- c. materiale della colonna;
- d. fase stazionaria ed eventuale supporto o tipo di fase legata;
- e. temperatura massima sopportabile dalla fase stazionaria;
- f. spessore del film (d_f) di fase stazionaria e rapporto di fase (β).



STRUMENTAZIONE





BOMBOLE E RIDUTTORI DI PRESSIONE



b

Bombola N°	437166
ARGON UQ	
Press. kg/cmq	200
Contenuto mc	10
Controllo	23.4.75
 CARTELLINO DI CONTROLLO  LABORAT. GAS PURI - LISCIATE	

c

Bombola N°	437166
Natura del gas	ARGON UQ
	OSSIGENO ~ 1.5 ppmV
	ANALISI: H2O ~ 3 ppmV
Press. kg/cmq	200
Contenuto mc	10
Data d'analisi	23.4.75
 CARTELLINO DI CONTROLLO  LABORAT. GAS PURI - LISCIATE	



Essiccatori e trappole

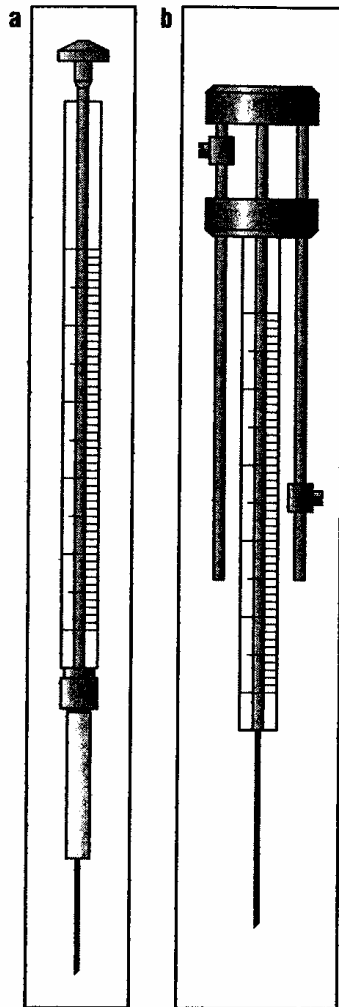
I *carrier* deve entrare in colonna **privo di tracce di umidità e di altre impurezze**

Per questo motivo sul percorso dei gas si pongono trappole riempite di **setacci molecolari essiccanti**.

Questi materiali, quando sono saturati, cominciano a rilasciare tutto ciò che hanno trattenuto, perciò devono essere cambiati o rigenerati ogni 2-3 mesi.

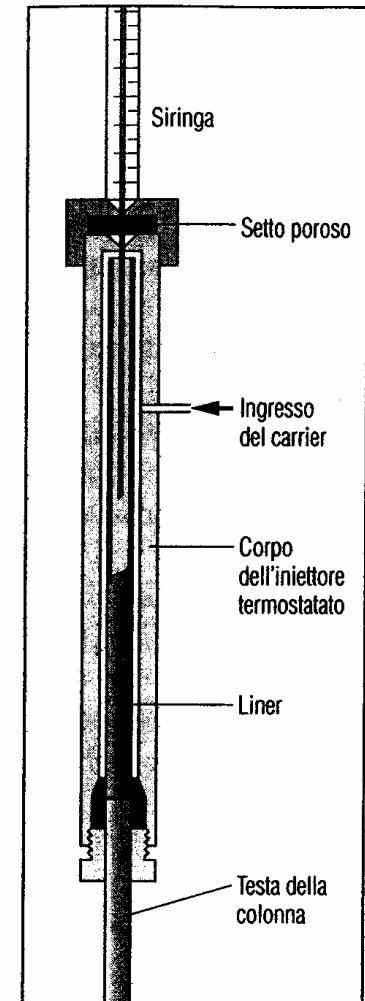
INIETTORI PER COLONNE IMPACCCATE

Introduzione di liquidi



(a) Il tubicino metallico fa in modo che l'ago raggiunga sempre la stessa posizione nell'iniettore,

(b) Siringa con dispositivo per non piegare il pistone.



Introduzione di gas

Si possono usare siringhe analoghe a quelle per i liquidi, ma di maggiore capacità. Poiché accuratezza e riproducibilità sono modeste, in genere si preferiscono i **dispositivi a valvola**.

Le **valvole multivia** consentono un campionamento preciso e riproducibile

