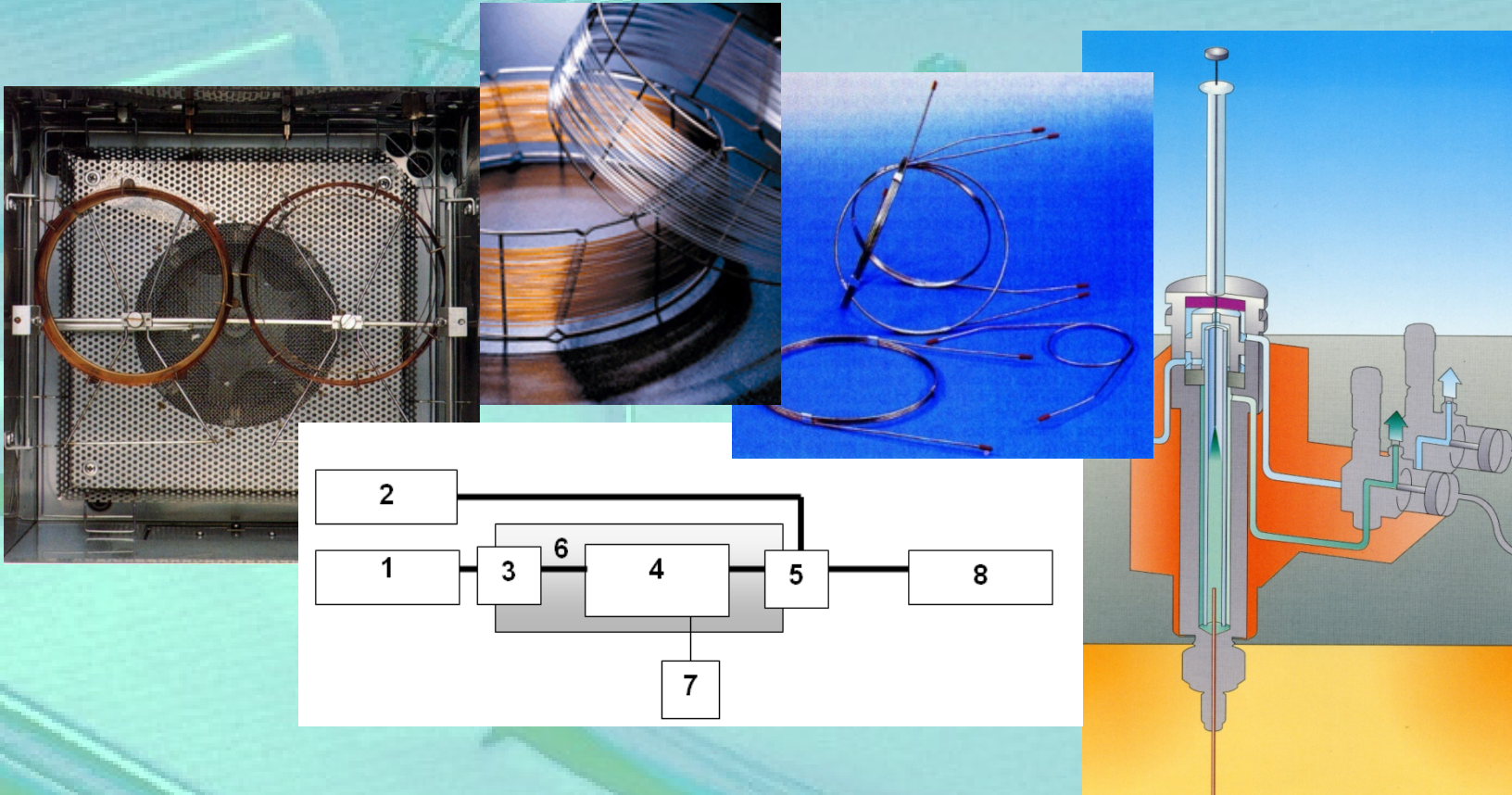


GASCROMATOGRAFIA



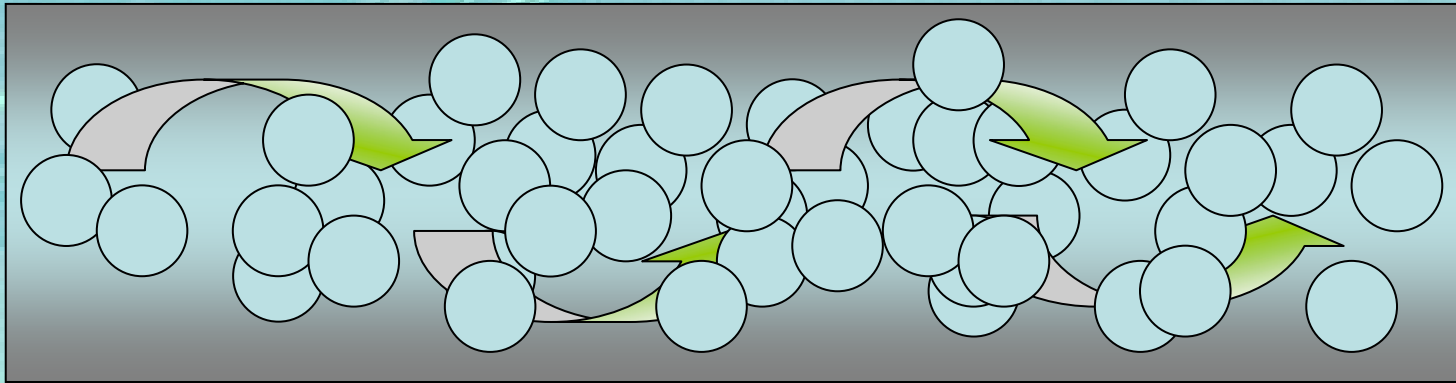
In gascromatografia (Martin e Synge 1941 e poi James e Martin 1952) la fase mobile è un gas che fluisce in una colonna in cui è posta la fase stazionaria.

I meccanismi di separazione dei componenti la miscela sono determinati dalla fase stazionaria, poiché quella mobile funziona solamente da gas di trasporto (carrier).

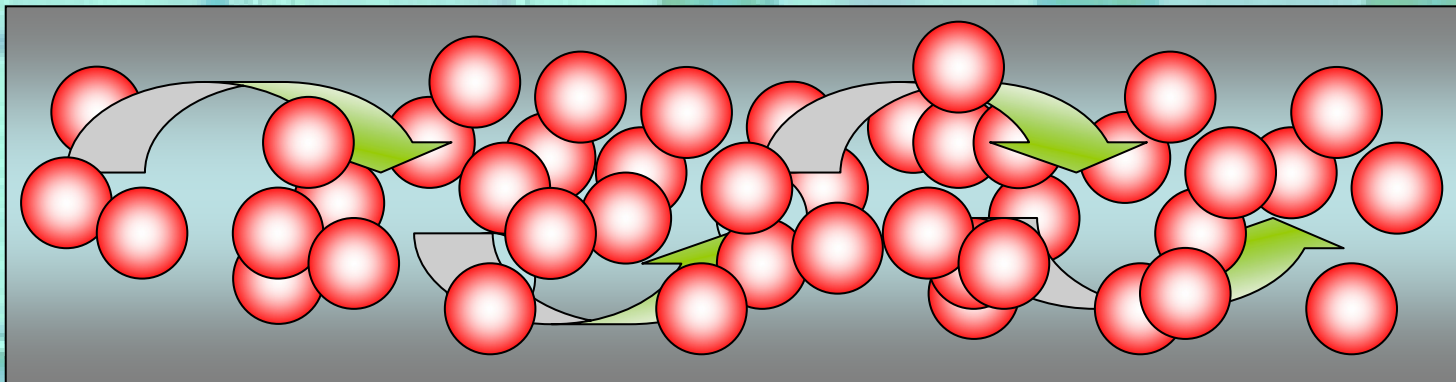
Condizione indispensabile per operare un'analisi gascromatografica su una miscela, è che essa sia in grado di passare in fase vapore alla temperatura di lavoro.

A seconda della fase stazionaria si parla di

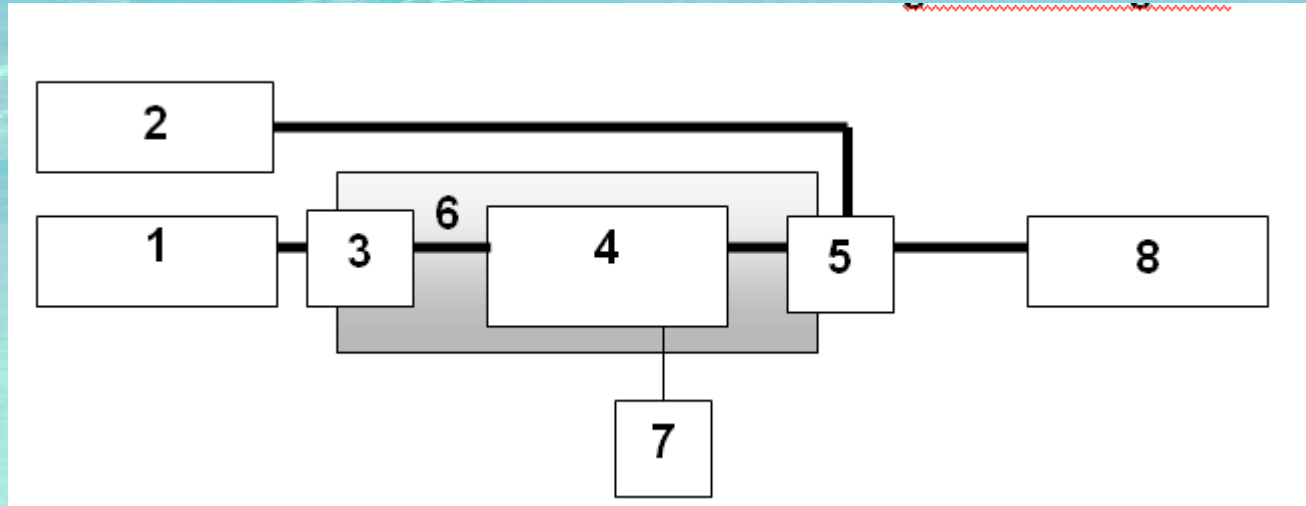
- Gas solido cromatografia (GSC)



- Gas liquido cromatografia (GLC)



Schema a blocchi di un gascromatografo



- 1) Sistema di alimentazione del carrier (bombola)
- 2) Sistema di alimentazione dei gas per il rivelatore (bombola)
- 3) Iniettore
- 4) Colonna

- 5) Rivelatore
- 6) Camera termostatica
- 7) Dispositivo per la programmazione della temperatura durante l'analisi
- 8) Raccolta ed elaborazione dati

La colonna

In entrambe le tecniche gascromatografiche, le colonne utilizzate possono essere:

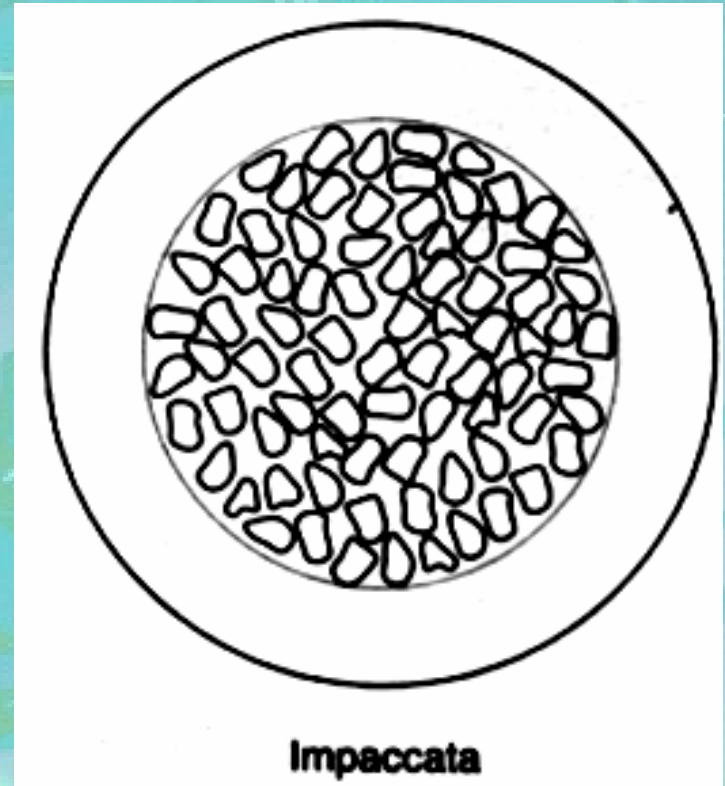
- colonne impaccate; le prime a essere utilizzate ancora attorno agli anni cinquanta.
- colonne capillari; le più recenti e anche le più differenziate come struttura.

Colonne impaccate

- La più classica delle colonne impaccate ha una lunghezza di 1-2 m ed un diametro interno nell'ordine di qualche millimetro.
- Date le notevoli dimensioni, essa è sempre avvolta a spirale, con l'unico scopo di ridurre l'ingombro. Il materiale più comunemente usato per la costruzione di colonne impaccate è l'acciaio inossidabile ma per sostanze molto reattive si preferisce l'uso di colonne in vetro. Anche il rame trova ancora un certo impiego ma limitato solamente a sostanze poco reattive quali possono essere gli idrocarburi.



- La colonna viene riempita con la fase stazionaria, costituita da un supporto inerte di appropriata granulometria, eventualmente imbevuto della fase stazionaria liquida.

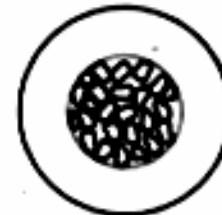


Colonne capillari

- Le colonne capillari sono sicuramente le più diffuse, la loro lunghezza è nell'ordine della decina di metri, (non mancano tuttavia colonne che arrivano anche ai 100 metri) il diametro si riduce a qualche decimo di millimetro.
- Ovviamente anche in questo caso si ritrovano avvolte in folte spirali su di un telaio di protezione. Il materiale più usato è il vetro o la silice fusa, se ne rintracciano però anche di rame e di acciaio inox.
- Grazie alla loro particolare struttura e lunghezza, esse consentono una più efficiente separazione dei componenti della miscela.



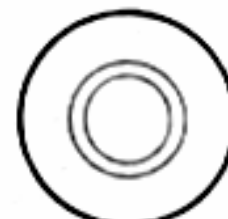
- Esistono vari tipi di colonne capillari, in relazione al diametro ed al modo in cui viene eseguito il riempimento. Nelle colonne di diametro inferiore (da 0,25 a 0,30 mm) il liquido di ripartizione viene posto direttamente all'interno sotto forma di un sottilissimo microvelo aderente alle pareti della colonna. Questo tipo di colonna viene identificata dalla sigla WCOT (Wall coated open tubular).
- In quelle a diametro maggiore (da 0,4 a 0,8 mm) oltre alla soluzione sopra citata si ritrovano in commercio colonne in cui la deposizione del liquido di ripartizione ha luogo su di uno strato di materiale poroso che riveste le pareti interne della colonna, sono chiamate SCOT (support coated open tubular). In relazione al diametro interno le colonne capillari si classificano in Narrow bore (0,25 mm), Wide bore (0,53 mm) e Mega bore (0,80 mm).



**Capillare
impaccata**



**WCOT
wide bore**

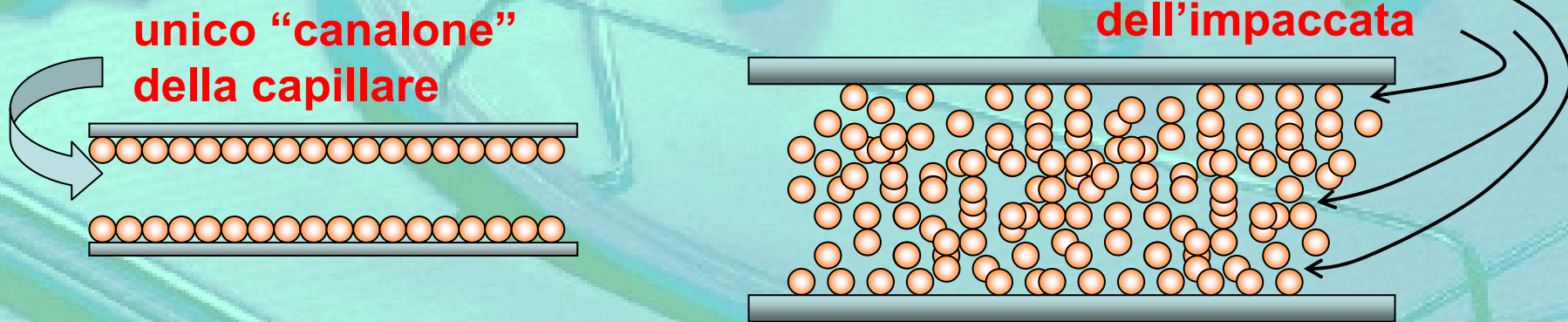


**WCOT
narrow bore**



SCOT

- Poiché in gascromatografia la fase mobile è un gas, l'uso di colonne impaccate molto lunghe, per aumentarne l'efficienza, comporta una notevole caduta di pressione che va a incidere su tempi e fattori di ritenzione.
- Il primo vantaggio che presentano le colonne capillari è che, pur avendo un diametro interno minore, offrono appunto al gas un canale di passaggio molto più grande.



- Questa caratteristica costruttiva incide sulla “permeabilità” di una colonna capillare ovvero sulla sua capacità di essere attraversata dal gas senza che esso subisca una sensibile caduta.
- Ciò consente una lunghezza molto più marcata per una capillare che, unita ad altri fattori ne fa aumentare l’efficienza.

	Impaccata	Capillare
Permeabilità relativa	1	100
Lunghezza in m	1-2	100-150
Numero piatti medio	4000	100000
Numero piatti massimo	8000	700000

- A livello di variabili costruttive di una **colonna impaccata**, abbiamo visto che, grazie alla **Van Deemter**, H è rappresentabile come

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

In realtà, poiché il coefficiente di diffusività in un gas è molto grande, il termine C_M è trascurabile e l'equazione diviene:

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

- Per una **colonna capillare**, le differenti caratteristiche costruttive consentono di prevedere che non esista il termine A; l'altezza del piatto teorico è rappresentabile con l'equazione di **Golay**

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

in cui il termine C_M viene espresso in altro modo ricorrendo alla variabile r , il raggio interno del canale di passaggio del gas.

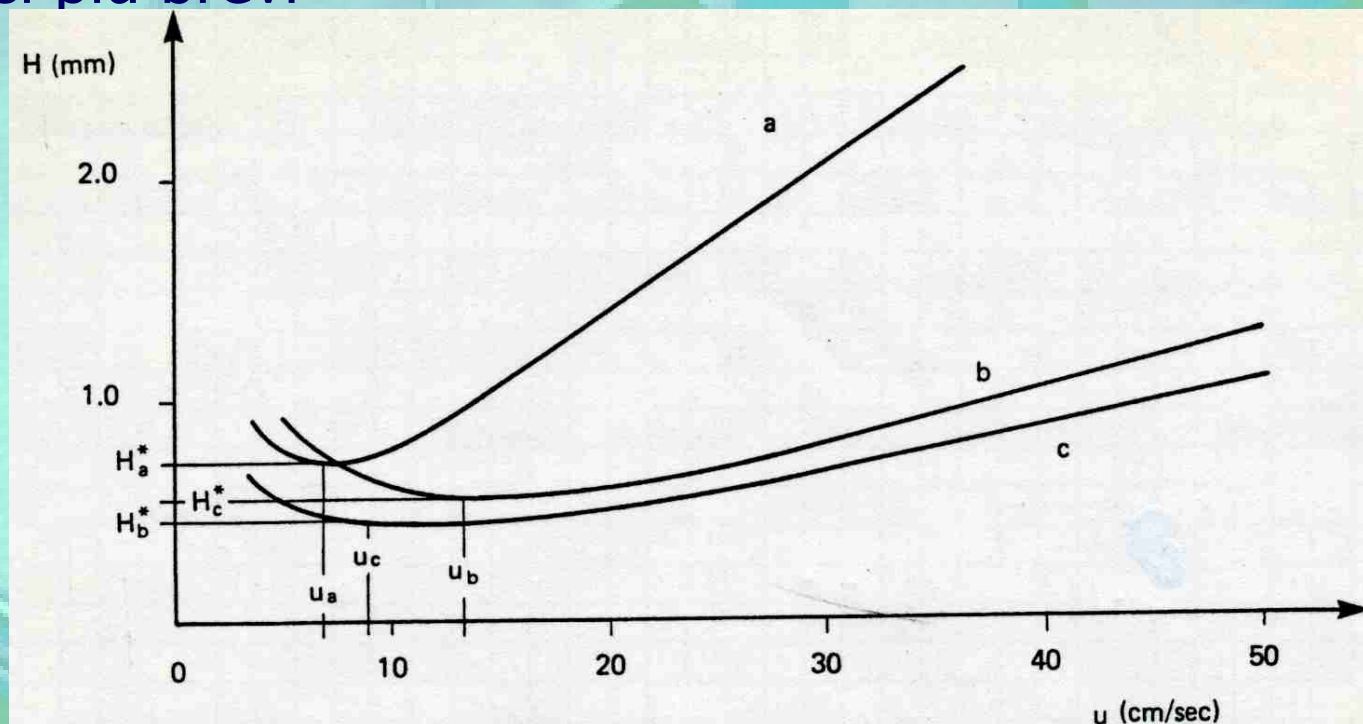
- Se avessimo usato questa espressione anche per una colonna impaccata, il valore da attribuire a r sarebbe stato quello dei canalicoli. Numericamente sarebbe stato molto piccolo e avrebbe confermato la trascurabilità di C_M per una impaccata

- Comunque, il termine C_M , già trascurabile in una impaccata è di poco peso anche in una capillare.
- Il termine C_S , riguarda invece la resistenza al trasferimento dell'analita nella fase stazionaria ed è inferiore per una capillare rispetto a una impaccata. Questo grazie al fatto che si ha un miglior contatto tra le due fasi in una capillare.

Globalmente:

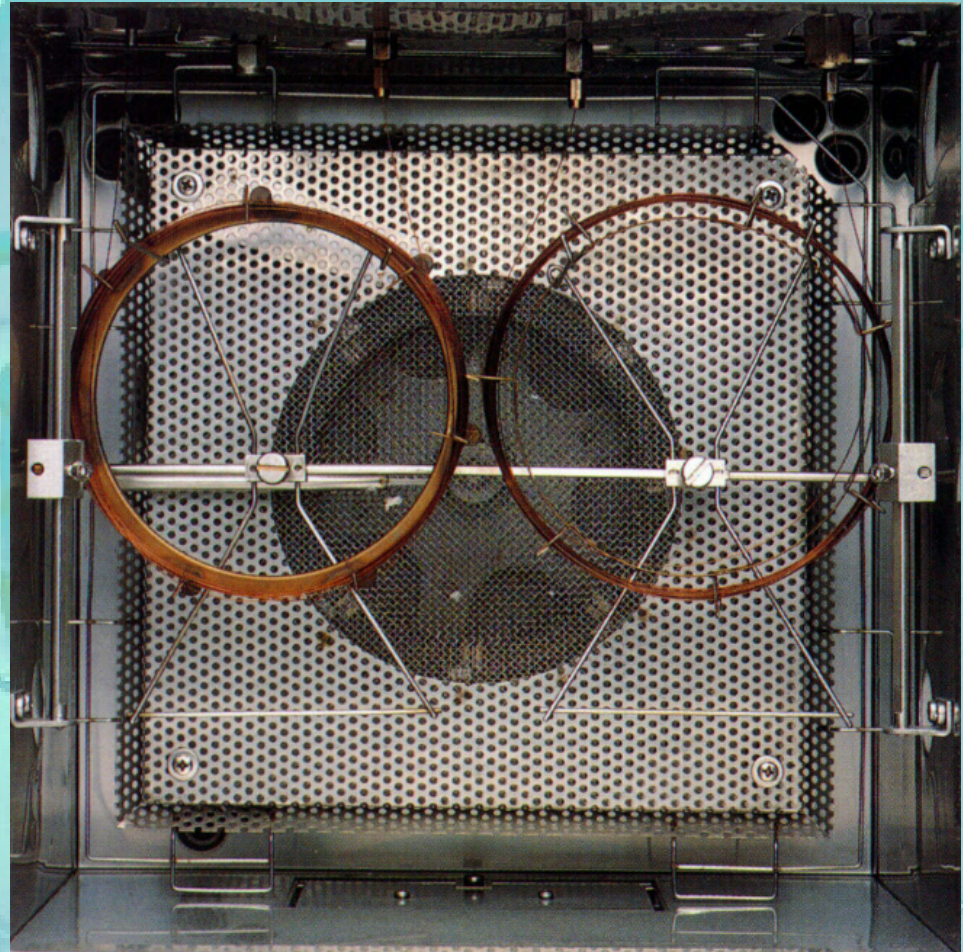
	C_S	C_M	C globale
Capillare (Golay)	+basso	poco+alto	+ basso
Impaccata (Van Deemter)	+alto	+basso	+ alto

- I vantaggi di una capillare rispetto a una impaccata possono essere così riassunti:
 - può essere molto lunga senza perdite di pressione
 - presenta un H più piccolo
 - il minimo di H è a portate maggiori
 - il termine C è più piccolo e dà una pendenza inferiore al ramo rettilineo.
- Una capillare è più efficiente e consente anche tempi di analisi più brevi



Camera termostatica

- In gascromatografia la temperatura della colonna rappresenta un parametro fondamentale per ottenere una buona separazione dei picchi.
- Le colonne vanno quindi termostatate in apposite camere entro le quali la temperatura resti il più possibile costante. Nel caso contrario la riproducibilità dell'analisi viene sensibilmente alterata.

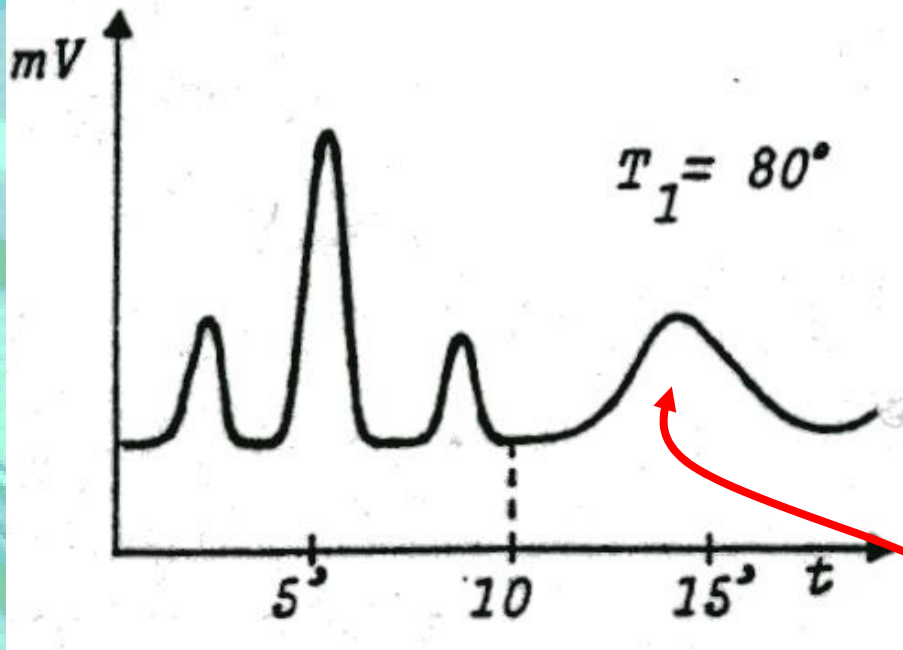
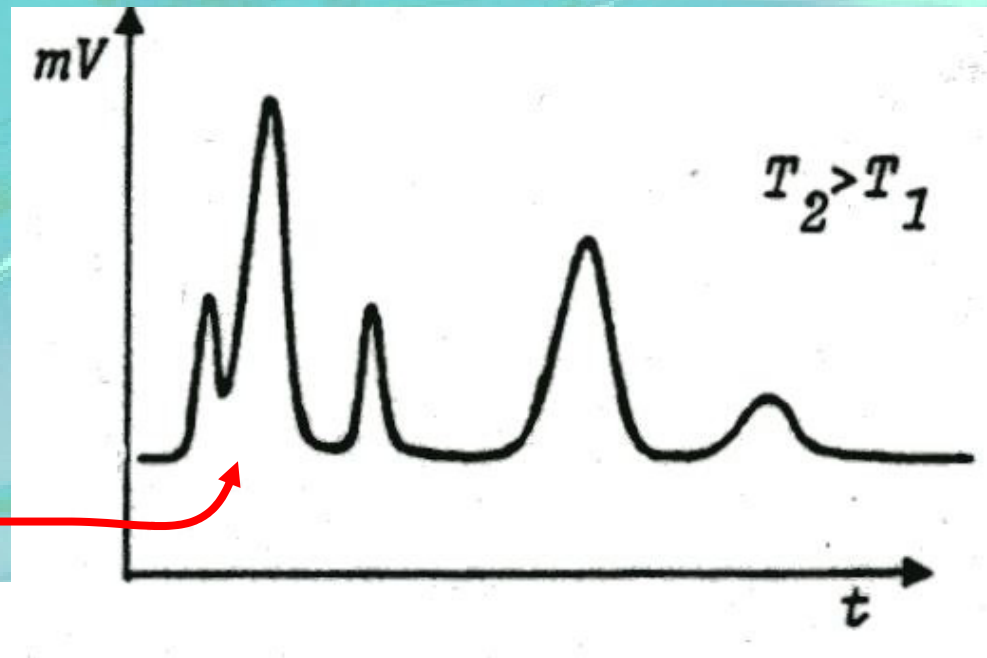


- Il più diffuso tipo di camera termostatica è quello a circolazione d'aria calda, sistema che garantisce una stabilità della temperatura nell'ordine di $0,1^{\circ}\text{C}$. La temperatura massima raggiungibile è di 400°C .
- L'uniformità della temperatura in ogni punto della camera viene garantita da una ventola posta al di sotto di un fondo forato. Durante la termostatazione la camera non andrebbe mai aperta soprattutto se si usano colonne in vetro.

Dispositivo per la programmazione della temperatura durante l'analisi

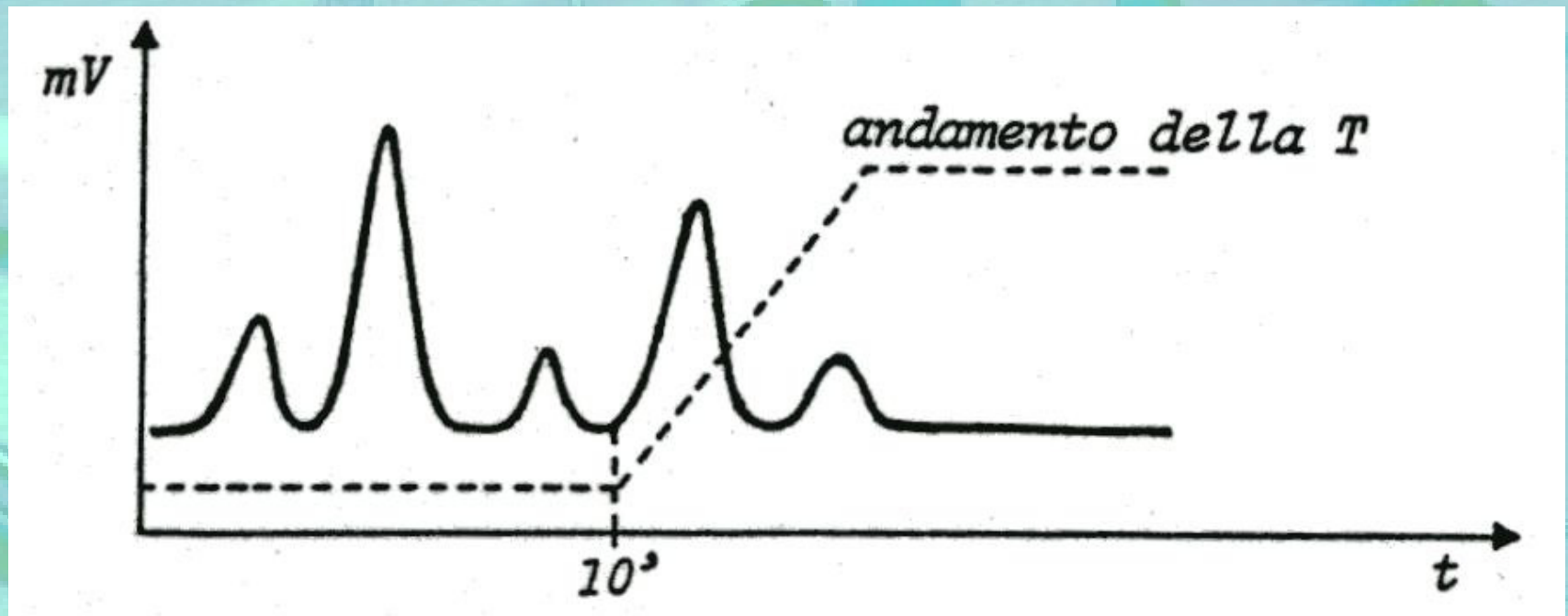
- Normalmente la temperatura della colonna è regolata sul valore corrispondente alla media dei punti di ebollizione dei componenti della miscela.
- Per miscele particolarmente complesse con punti di ebollizione troppo distanti tra di loro la scelta della temperatura è problematica.

- Per tali miscele un temperatura troppo alta consentirebbe una buona separazione dei componenti altobollenti ma ammasserebbe quelli più bassobollenti.



- Al contrario, una temperatura troppo bassa, non consentirebbe di separare quelli altobollenti.

- Sui più recenti gascromatografi trova spazio tra i componenti anche il dispositivo che permette di programmare la temperatura d'analisi. La temperatura viene mantenuta bassa per i primi picchi e poi innalzata per consentire la risoluzione delle sostanze altobollenti. Il tempo di riscaldamento e le diverse temperature vengono trovate per tentativi tenendo presente che è sconveniente usare velocità di riscaldamento maggiori di $40\text{-}50^\circ\text{C}/\text{min}$



- L'apparecchio non è altro che un timer che collegato al dispositivo riscaldante va a variare, a intervalli di tempo decisi da noi, la temperatura all'interno della camera termostatica.
- Nei moderni strumenti la programmazione è di tipo lineare, e prevede le seguenti tappe:
 - Isoterma iniziale: indica quanto tempo si rimane a una determinata temperatura.
 - Fase di rampa: si stabilisce la temperatura da raggiungere e con quale velocità.
 - Isoterma finale: indica il tempo che si deve restare alla temperatura più alta.
 - Raffreddamento: si attua dopo la fine della registrazione del cromatogramma,

Iniettore

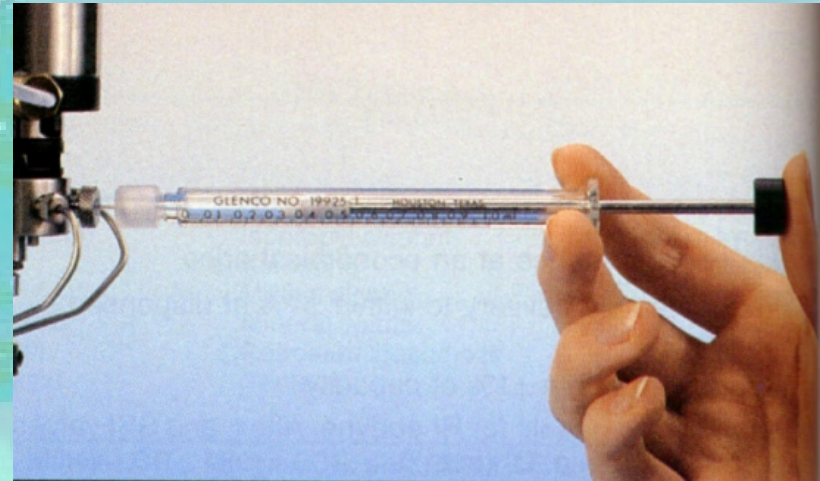
L'iniettore è un dispositivo posto immediatamente prima della colonna che ha la funzione di consentire l'introduzione del campione in essa. Dipende dal tipo di colonna.

Iniettori per impaccate

Sono formati da un corpo cilindrico, di cui un'estremità è posta all'esterno dello strumento, mentre l'altra è collegata mediante una boccola di fissaggio alla colonna.

Nella parte frontale si trova il foro per introdurre l'ago nella cavità centrale, protetta dall'ambiente esterno da una guarnizione di uno speciale polimero resistente alle alte temperature.

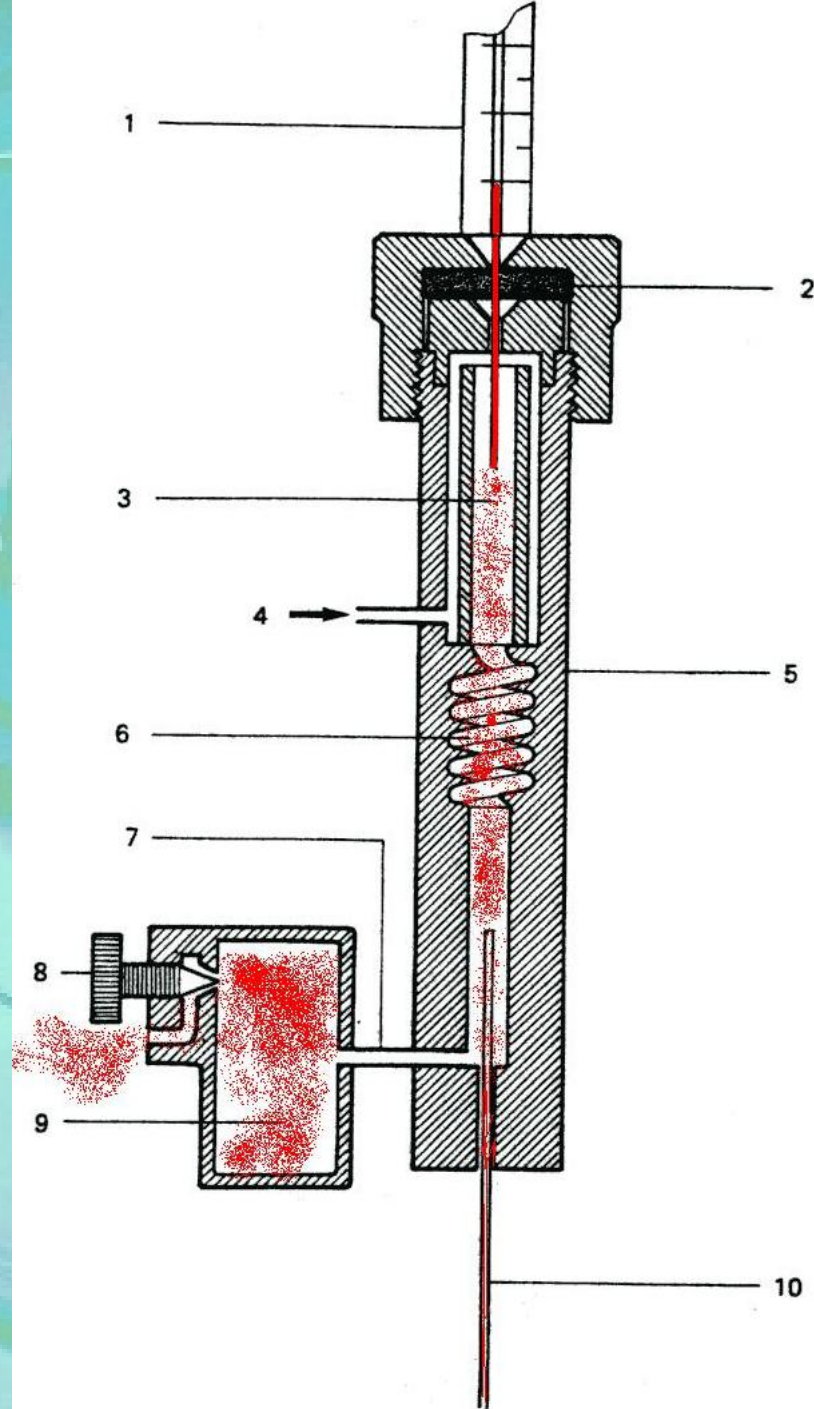
L'iniezione viene eseguita con apposite siringhe o, nel caso di campioni gassosi, con speciali valvole.



- Le colonne capillari possono accettare solo una piccola quantità di sostanza prima di intasarsi. Per iniettarvi la quantità ottimale si ricorre a differenti soluzioni.

Iniettori per capillari a tecnica split

1. Siringa; 2. setto poroso; 3. zona di evaporazione del campione; 4. ingresso del carrier; 5. corpo dell'iniettore, termostato; 6. camera di miscelazione; 7. spurgo (vent); 8. valvola di regolazione dello spurgo; 9. polmone; 10. testa della colonna capillare.

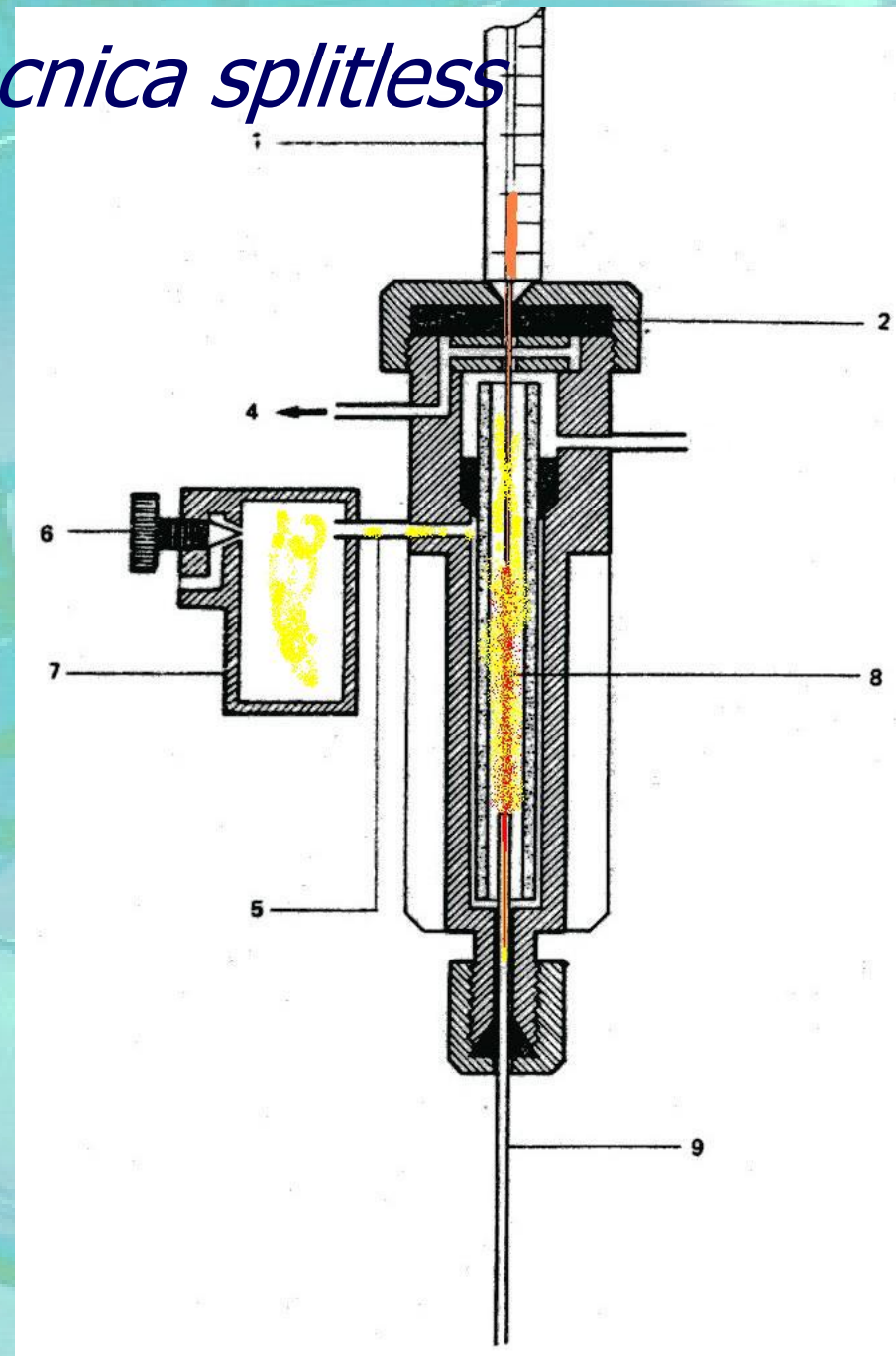


- In questo iniettore il campione viene premiscelato con il gas di trasporto. Di questa miscela solo una parte passa realmente nella colonna, mentre buona parte viene indirizzata verso la valvola regolabile di spurgo. Gli iniettori a tecnica split sono indicati per colonne capillari di tipo SCOT e WCOT specie se queste ultime sono di piccolo diametro.
- Il sistema è utilizzabile per miscele di composti con p.e. non troppo diverso perché in caso contrario si avrebbe una vaporizzazione non omogenea e il bloccaggio della frazione altobollente nella camera di vaporizzazione.
- Il sistema difetta per la riproducibilità che viene migliorata con l'introduzione di setti in vetro che riducono anche drasticamente la discriminazione dei composti altobollenti.

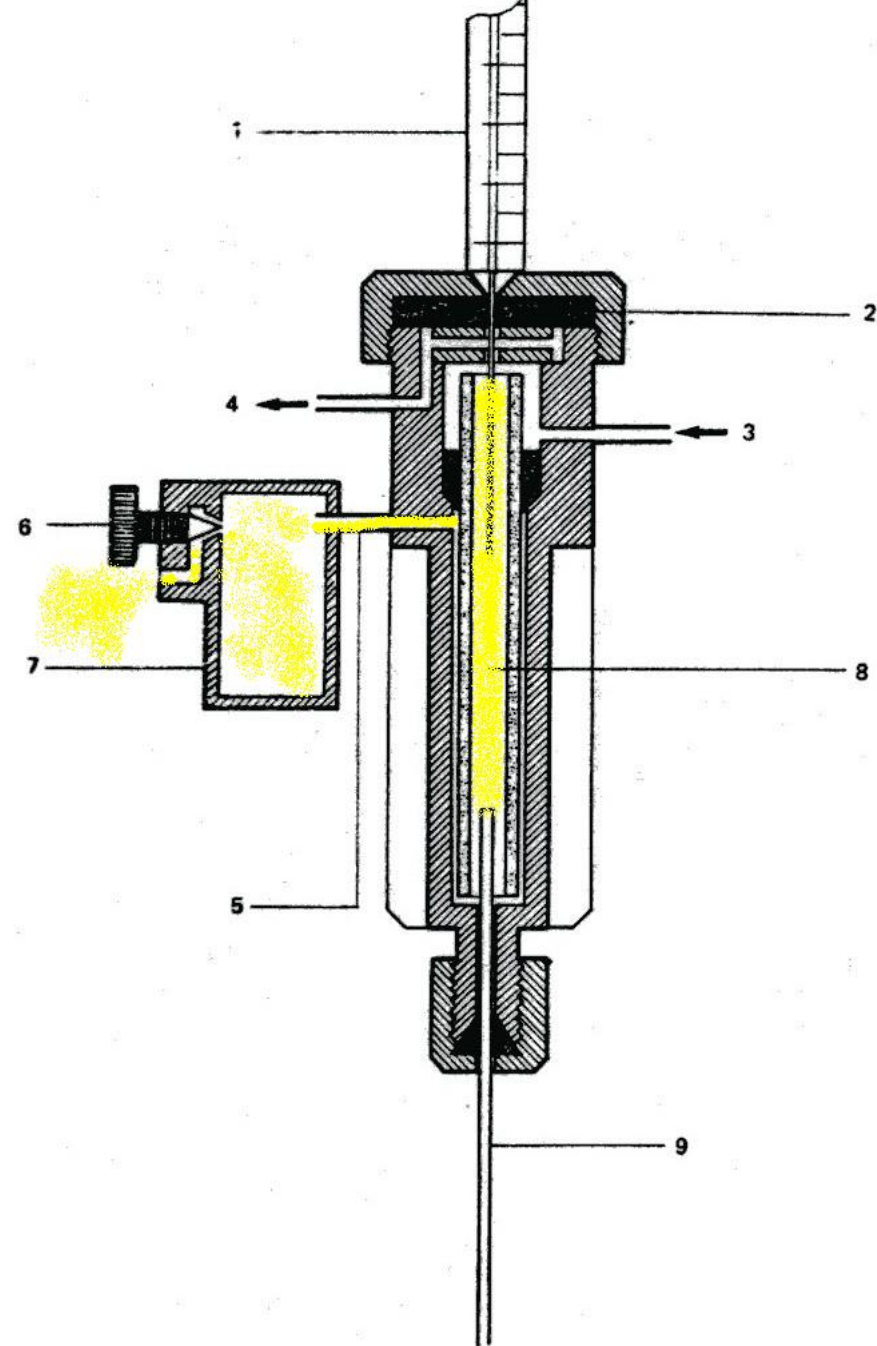
Iniettori per capillari a tecnica splitless

- In questa tecnica la miscela è contenuta in un solvente con temperatura di ebollizione 20-25°C più basso di quello del componente più volatile. Il carrier fluisce sotto il setto, per tenerlo pulito, dalla valvola di split e dentro la colonna. Subito prima dell'iniezione, lo spurgo viene chiuso e il flusso del carrier si dirige solo nella colonna. Fino a che lo split rimane chiuso si ha ingresso in colonna prevalentemente della miscela con solo una porzione del solvente che, più facilmente volatilizzabile, tende a disperdersi in tutto lo spazio disponibile.

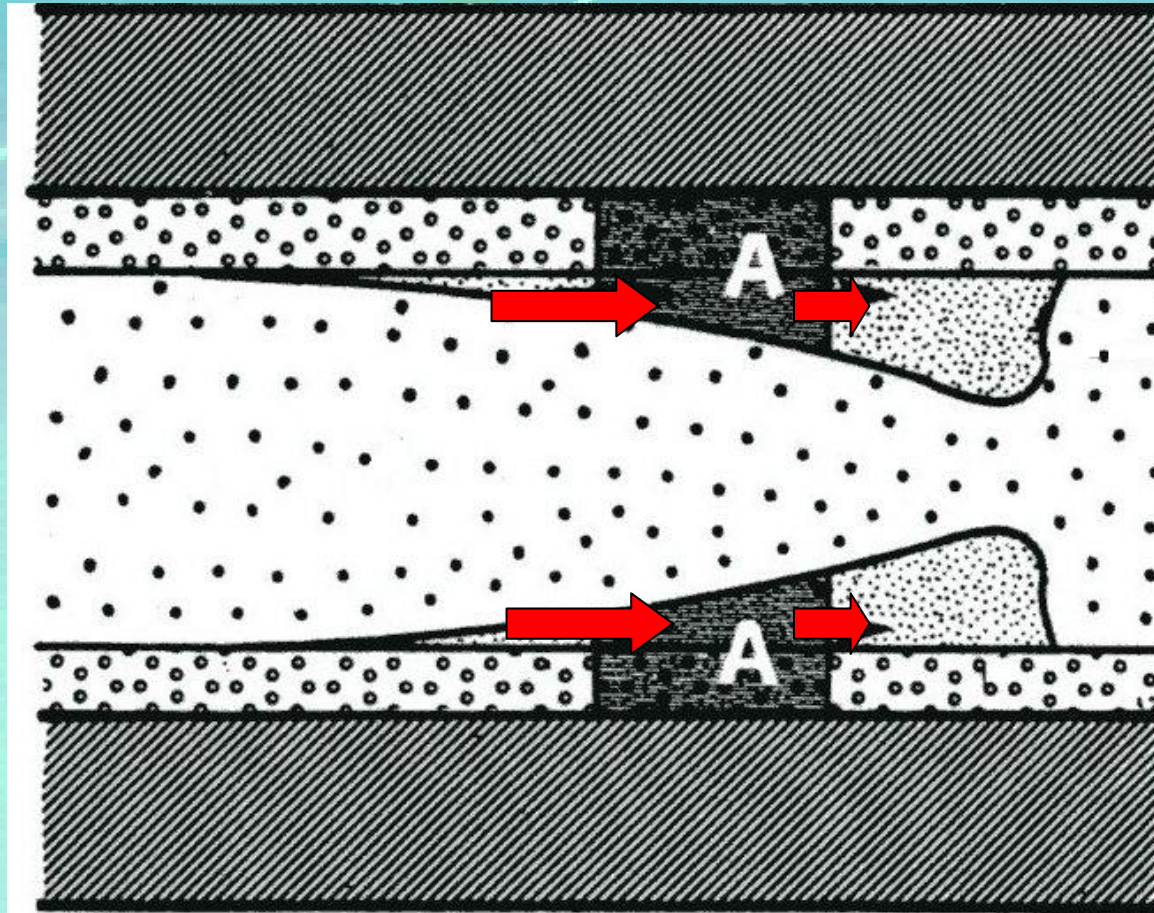
Gasromatografia



- Alla fine dell'iniezione lo splitter viene riaperto e il solvente viene in buona parte eliminato. La testa della colonna è tenuta a una temperatura inferiore di quella di ebollizione del solvente che così condensa subito e intrappola le sostanze componenti la miscela.



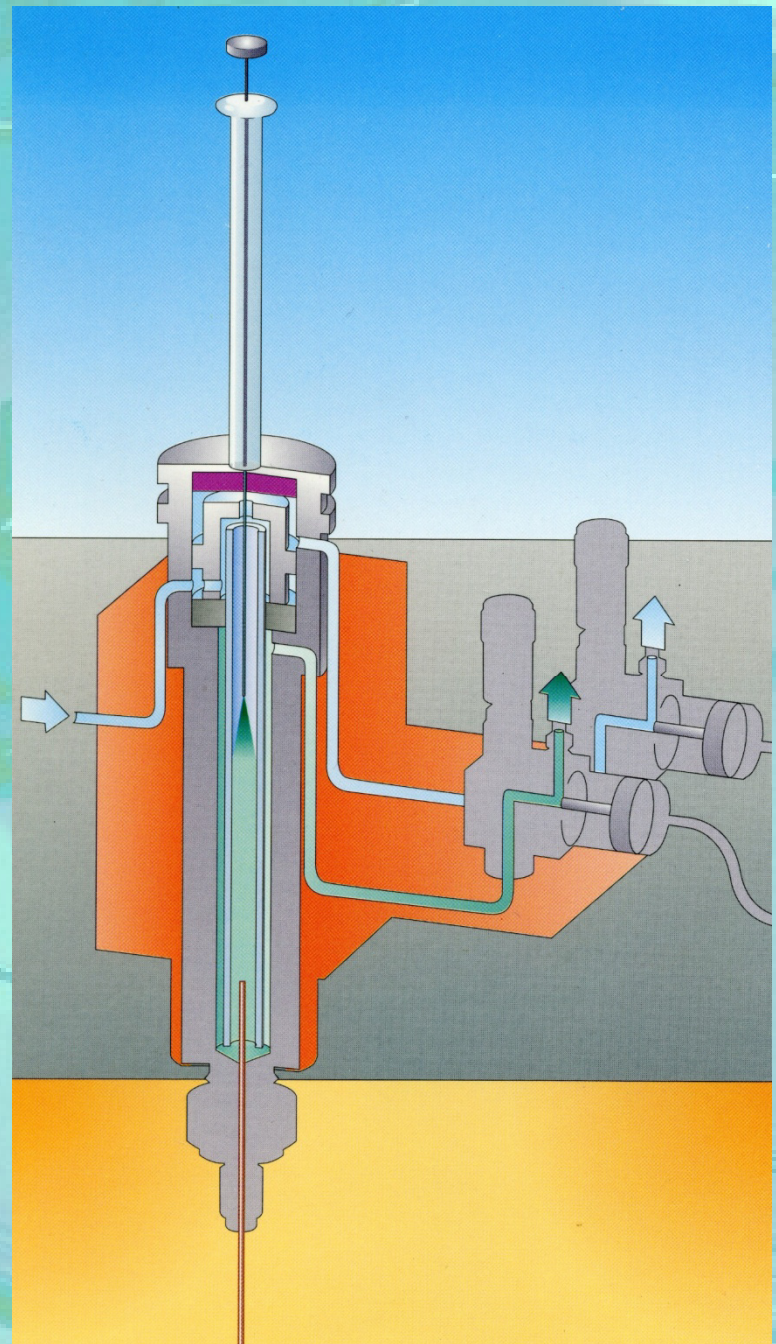
- Poiché le sostanze sono più concentrate nella coda al solvente, esse viaggeranno più velocemente che nella zona di testa con l'effetto di compattare la banda che avanza.



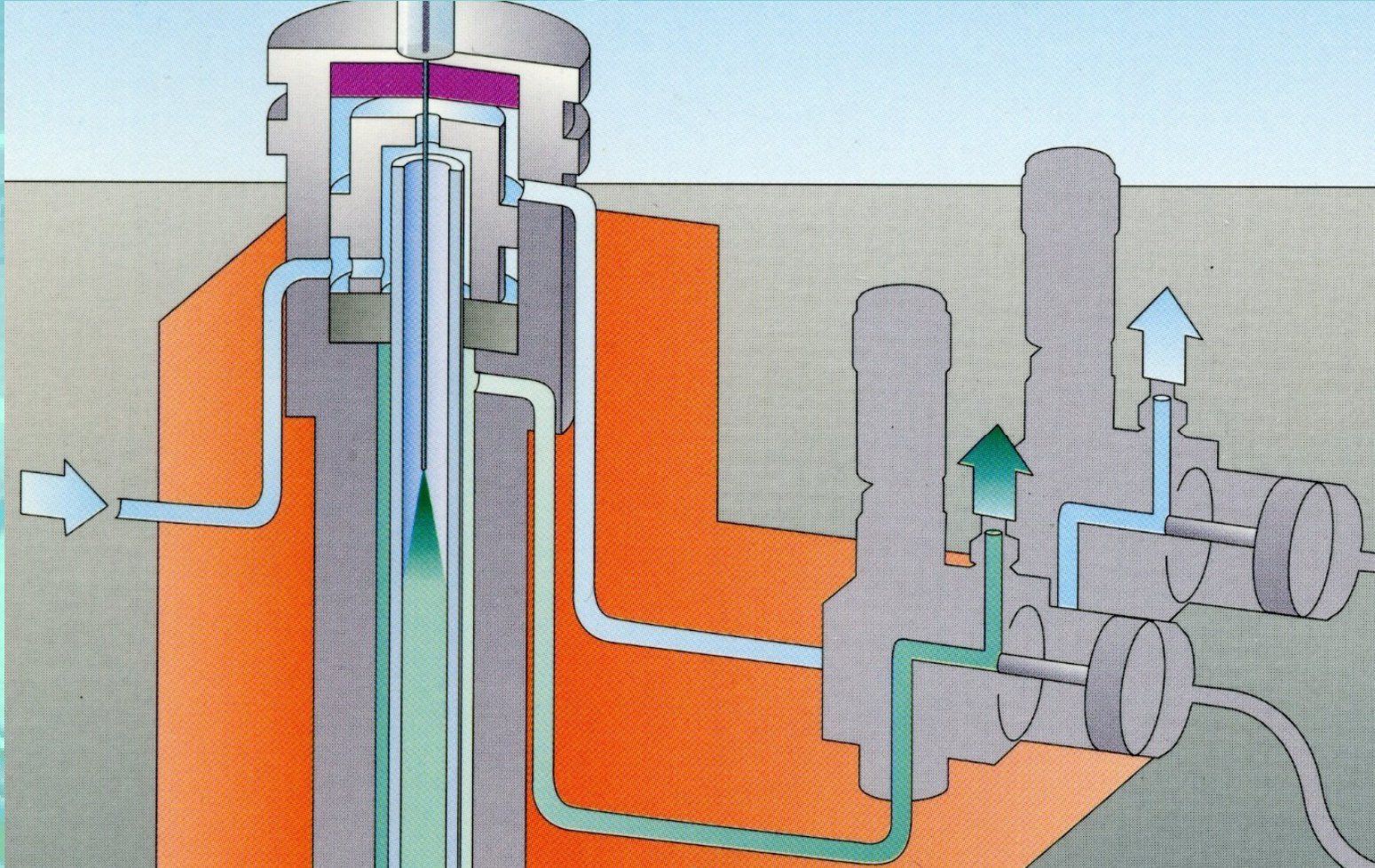
- Tale tecnica è divenuta molto accurata e precisa, tanto da farla preferire alla *tecnica split*.

Iniettori per capillari a tecnica split/splitless

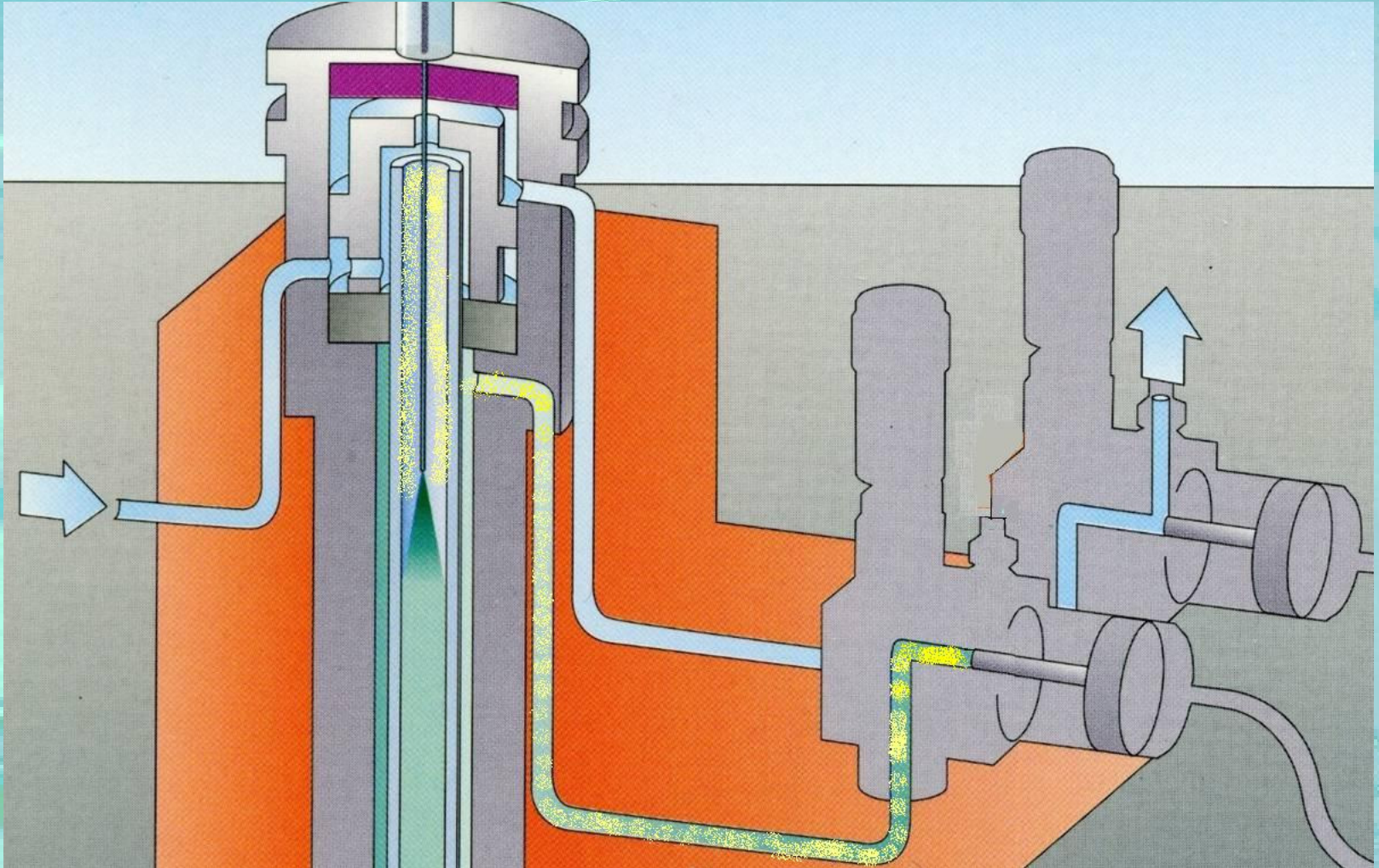
- Esistono iniettori in grado di utilizzare, grazie alla chiusura di alcune valvole, alternativamente le due tecniche



- Nella versione split, la valvola di spurgo è aperta durante l'iniezione e si ha solo una piccola parte della miscela che entra in colonna

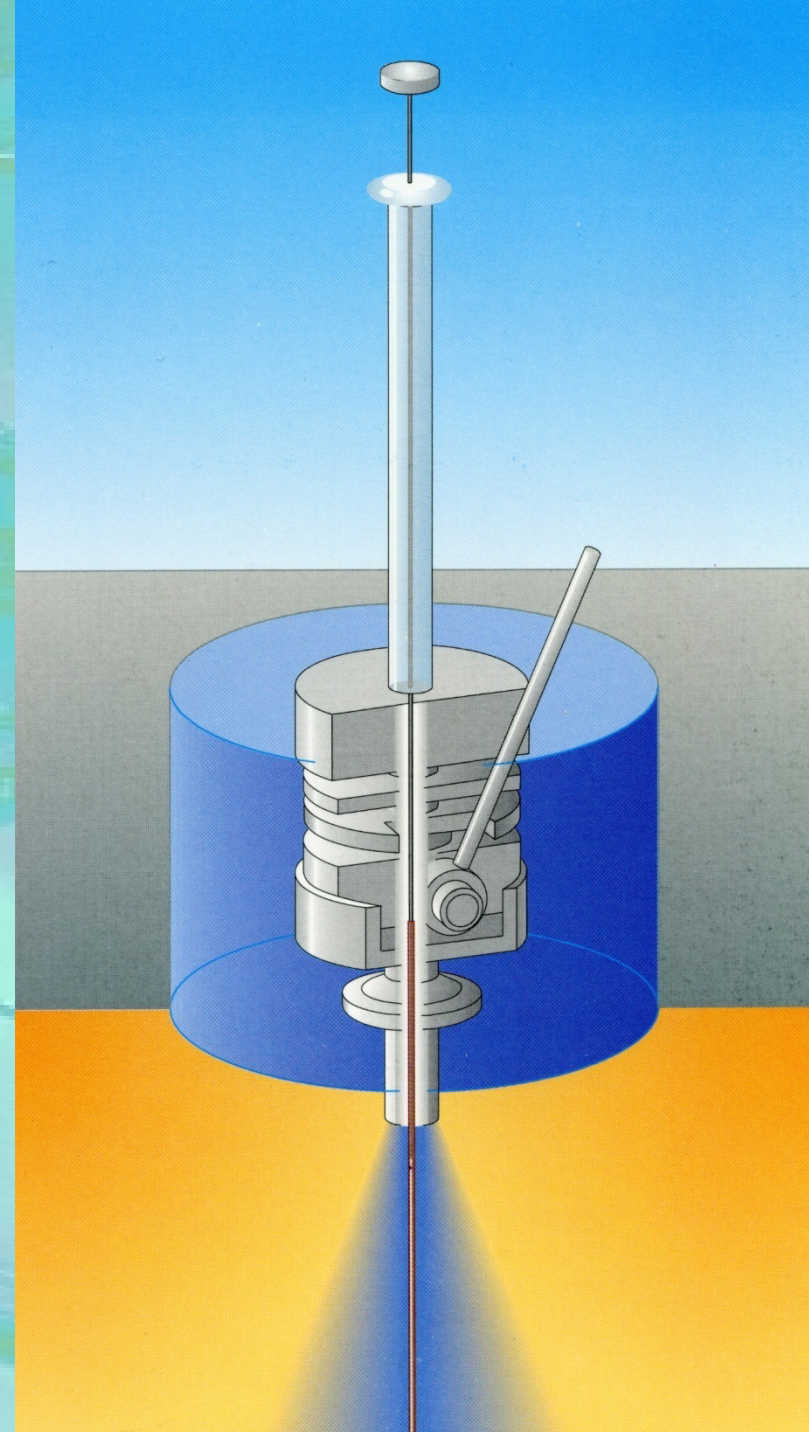


- Nella versione splitless, la valvola di spurgo è chiusa durante l'iniezione, e la miscela entra in colonna assieme al solvente. Gran parte del solvente, più volatile, tende a rimanere nella camera di vaporizzazione e verrà eliminato quando viene aperta la valvola di spurgo.



Iniettori per capillari on column

- La recente costruzione di siringhe capaci di iniettare anche pochi nanolitri ha consentito la costruzione di iniettori che immettano il campione direttamente in colonna.
- Gli iniettori On-Column non presentano la guarnizione di protezione (sarebbe troppo difficile bucarla con l'ago) ma bensì una valvola che si apre all'istante quando l'ago sta per toccarla, e si richiude subito dopo la sua uscita.



Iniettori per capillari PTV

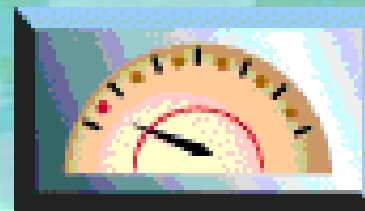
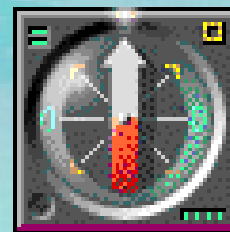
- L'iniettore PTV unisce i vantaggi degli iniettori split, splitless e on-column.
- Il campione viene in genere iniettato in un inserto freddo, in modo che non si verifichi discriminazione nell'ago. Quindi la temperatura viene aumentata per poter vaporizzare il campione. L'utente programma i tempi di scarico e la temperatura per ottenere l'equivalente del trasferimento split o splitless dei vapori di campione in colonna.
- L'iniezione PTV, grazie alla sua flessibilità, è considerata il sistema più universale per l'introduzione del campione.

Vantaggi

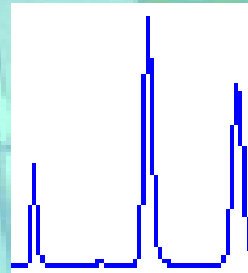
- nessuna discriminazione nell'ago
- discriminazione dell'iniettore minima
- nessuna necessità di siringhe speciali
- possibilità di volumi di iniezione elevati
- eliminazione di solventi e altri componenti a basso punto di ebollizione
- intrappolamento di composti non volatili nell'inserto
- funzionamento split o splitless
- tempo di iniezione e area riproducibili con valori simili a quelli dell'iniezione on-column a freddo

Rivelatore

- Il **rivelatore** (o **detector**) è un dispositivo posto subito dopo il termine della colonna con la funzione di indicare la presenza del componente all'uscita della colonna, e di fornire la misura della concentrazione di esso nel gas di trasporto.

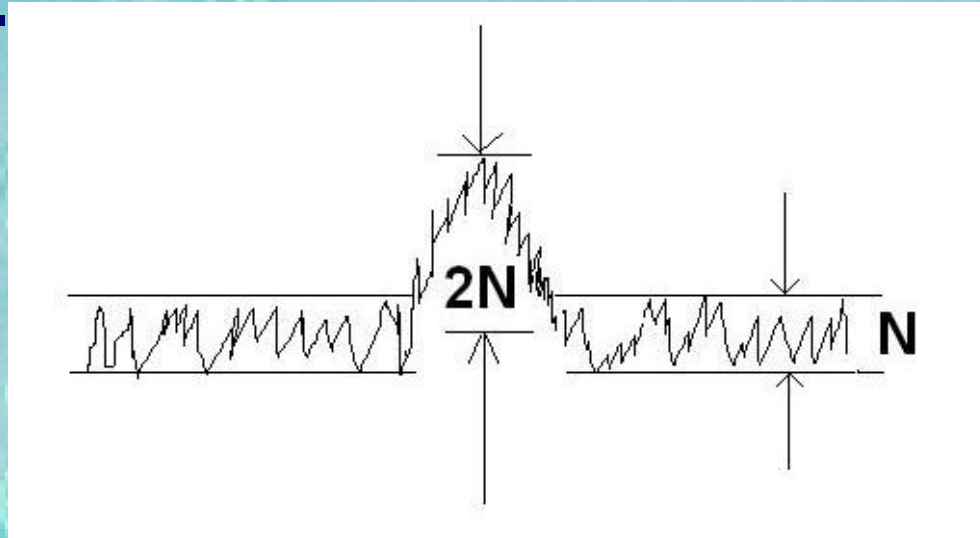


- **Segnale o risposta;** ogni rivelatore traduce in un segnale elettrico, espresso in mV o μV , la presenza di una sostanza. Il segnale elettrico, che può essere proporzionale alla concentrazione del componente rivelato o alla sua massa, viene trasformato generalmente in un grafico.



- **Sensibilità;** rapporto tra segnale e analita (concentrazione o massa).

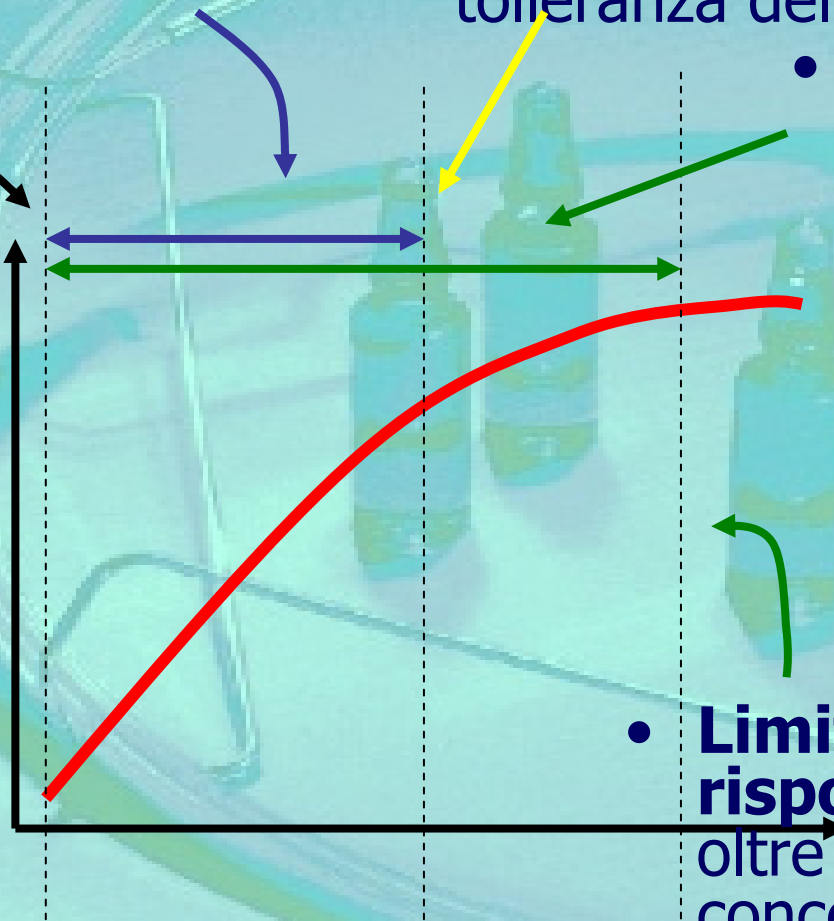
- **Rumore di fondo (noise)**; è la fluttuazione del segnale che si ha quando nel gas di trasporto non si ha alcuna sostanza (è di origine elettrica o dovuto a impurezze del gas di trasporto).



- **Limite di rivelabilità**; è la concentrazione di sostanza in grado di fornire un segnale pari ad almeno il doppio del rumore di fondo.
N.B. L'amplificazione del segnale non può discriminare il rumore di fondo dal ciò che proviene dal campione.

- **Intervallo di linearità;** range di concentrazioni compresa tra il limite di rivelabilità e il limite di linearità.


- **Limite di rivelabilità;** è la concentrazione minima che dà una risposta doppia del rumore di fondo



- **Limite di linearità;** è la concentrazione massima al di là della quale il segnale non è più proporzionale alla concentrazione (con una tolleranza del 5%).

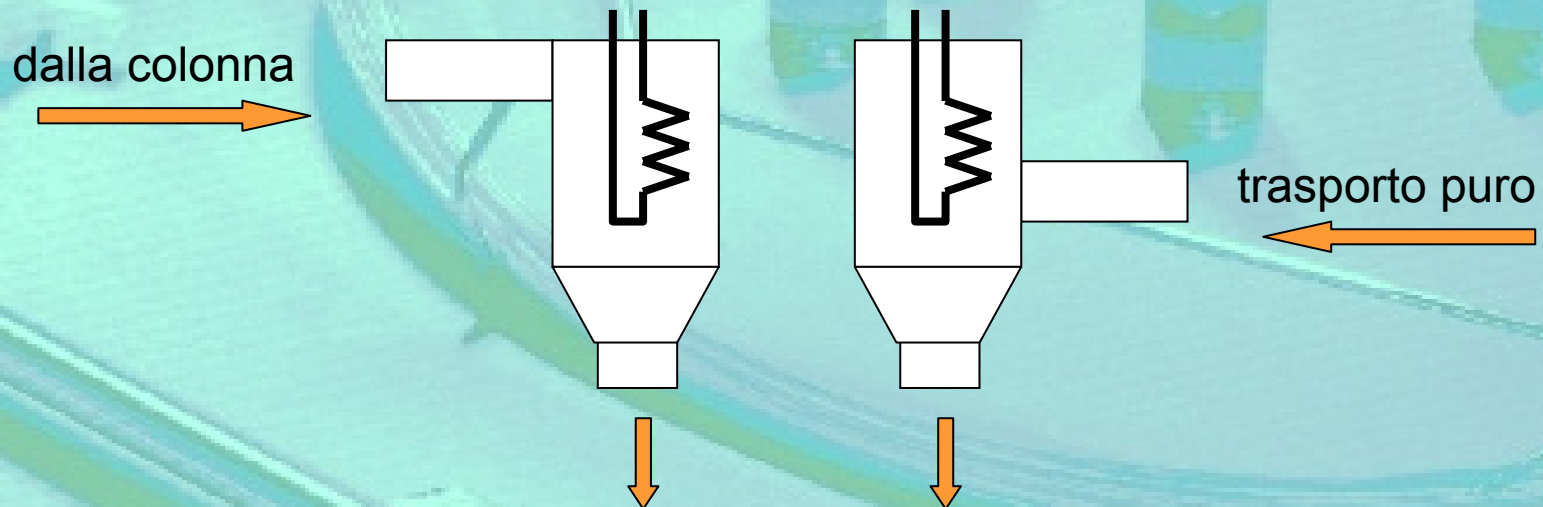
- **Intervallo di risposta dinamico;** intervallo di concentrazioni entro il quale il rivelatore risponde, anche se non in maniera lineare

- **Limite intervallo di risposta dinamico;** oltre questa concentrazione non si possono fare misure

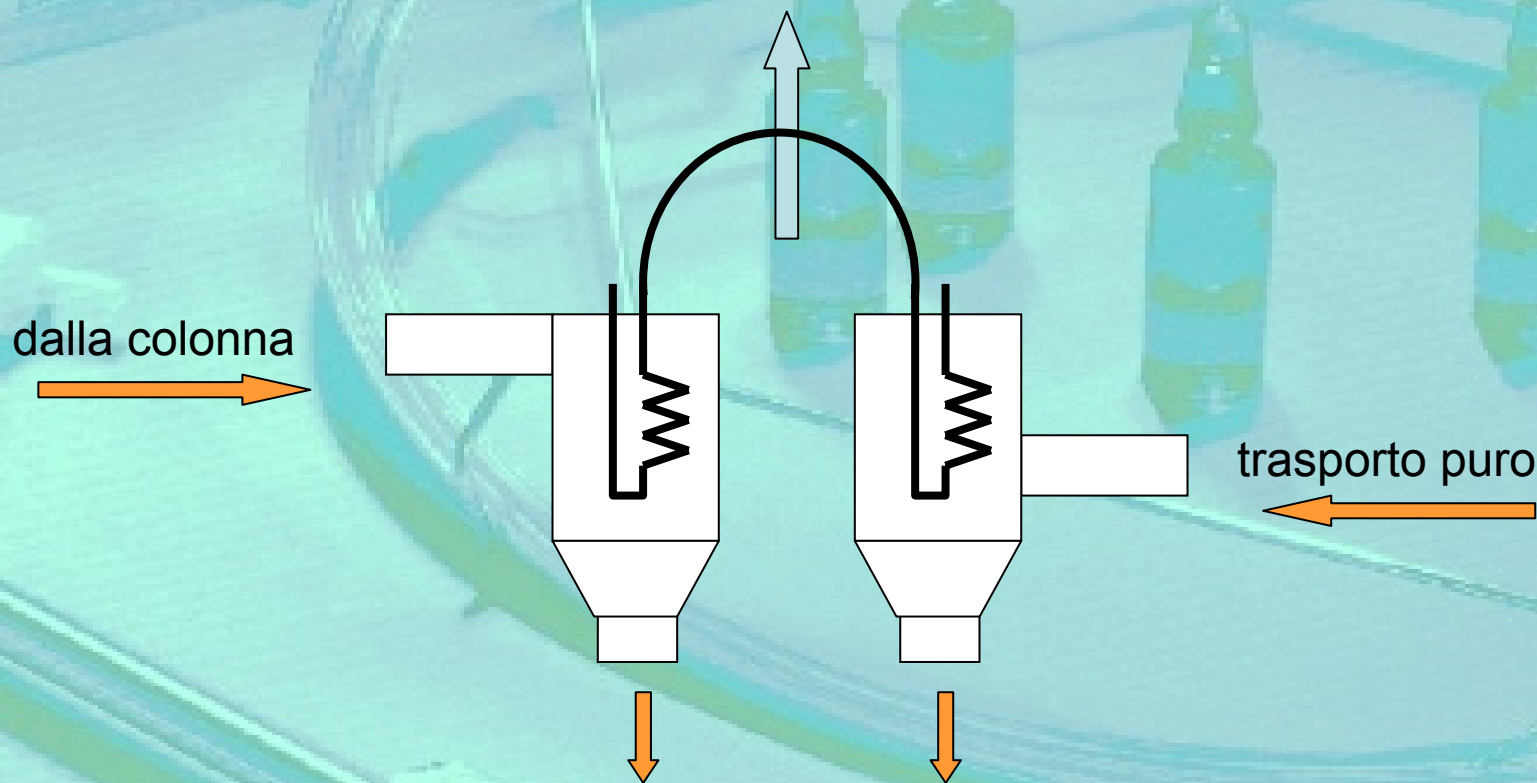
- 
- **Selettività**, in base alla quale i rivelatori si dividono in:
 - universali cioè in grado di individuare tutti i componenti di una miscela
 - selettivi cioè in grado di rilevare solo particolari categorie di composti.

Rivelatore a termoconducibilità HWD (hot wire detector)

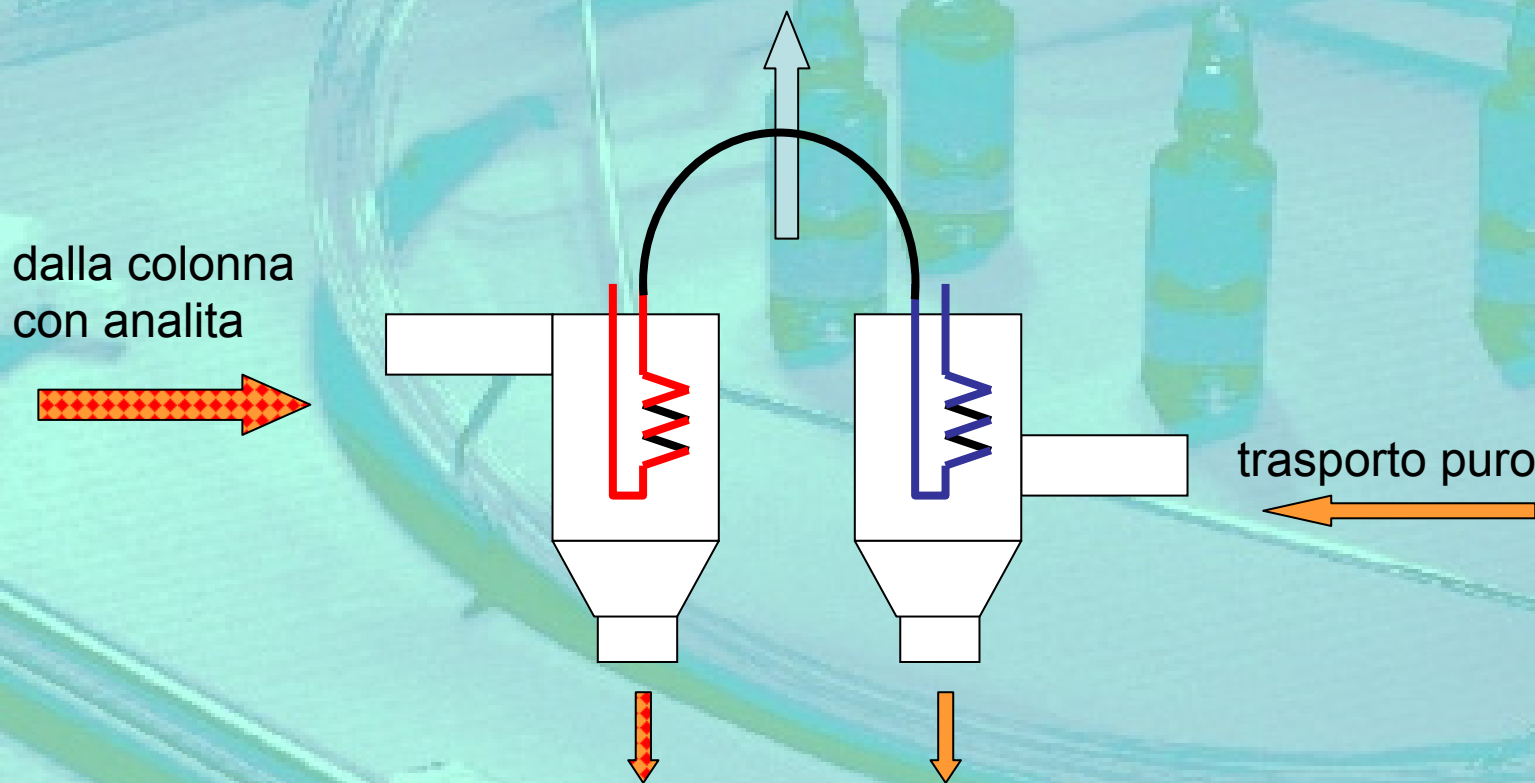
- E' il rivelatore a filo caldo: è fatto da due resistenze lambite, l'una, dal gas di trasporto in entrata e, l'altra, da quello in uscita dalla colonna.
- Le resistenze sono attraversate da corrente e la loro conducibilità elettrica dipende dalla temperatura a cui sono.
- La forma delle due celle è diversa per compensare eventuali variazioni di flusso



- Il gas che lambiscono le resistenze, le raffreddano in modo che dipende dalla loro capacità termica e cioè di quanto calore sono in grado di sottrarre.
- Quando esse sono lambite dallo stesso gas (trasporto puro perché dalla colonna non esce nulla) sono raffreddate nello stesso modo e non si ha sbilanciamento elettrico.



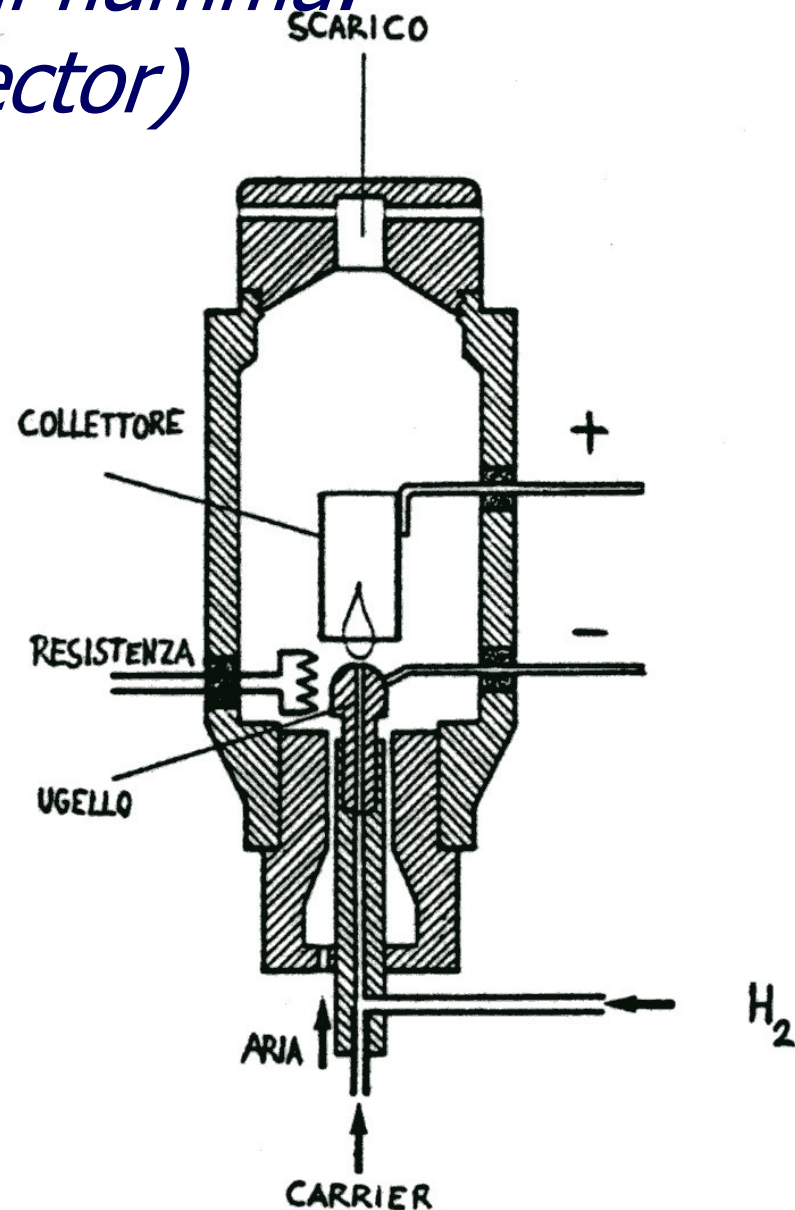
- Quando le resistenze sono lambite da gas diversi, uno è quello di trasporto puro e l'altro contiene anche l'analita che esce dalla colonna, esse sono raffreddate in modo diverso, vanno a temperature diverse e comportano uno sbilanciamento elettrico.

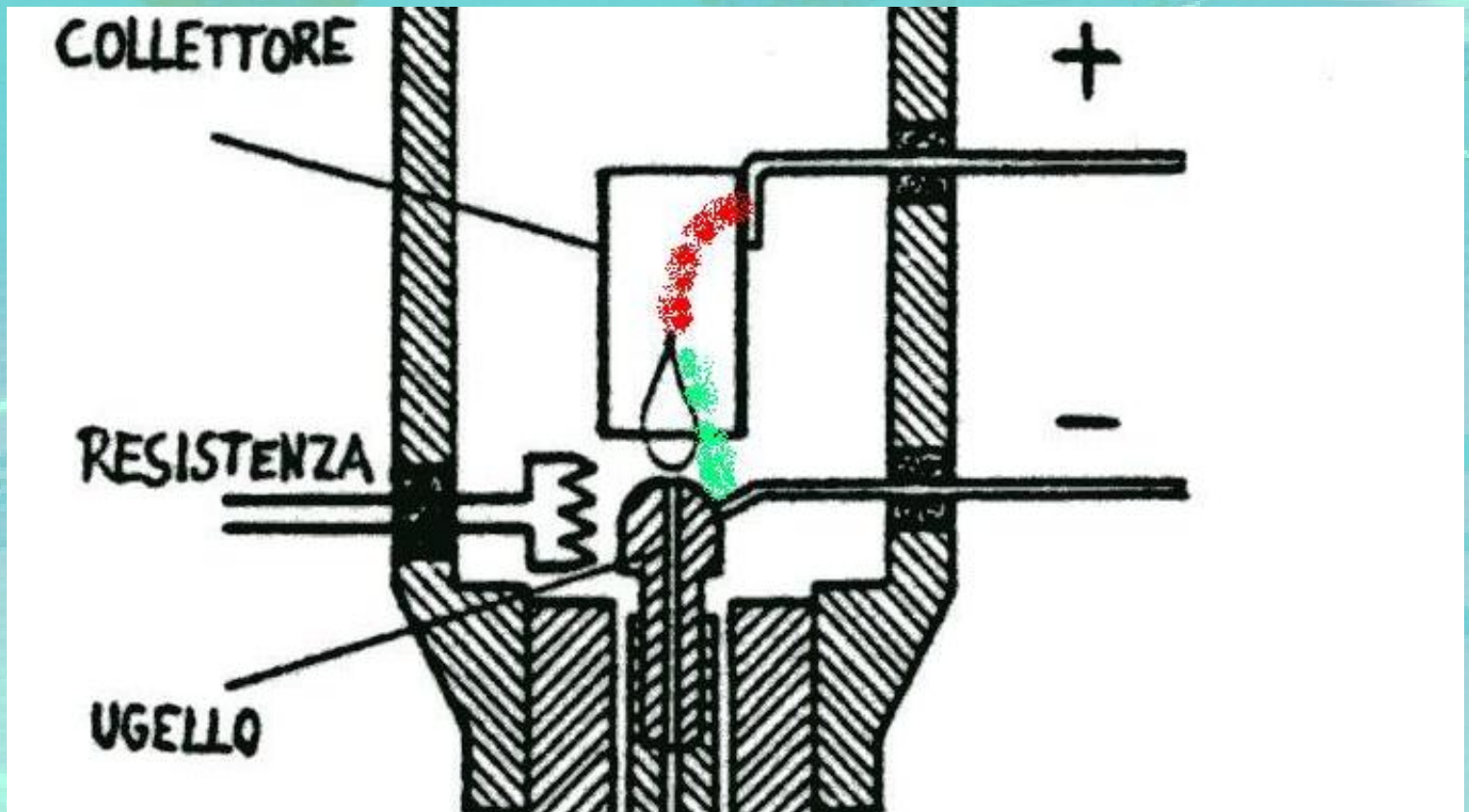


- Tutte le sostanze provocano una variazione di conducibilità termica del carrier, per cui l'HWD non è selettivo ma universale
- Per ottenere buona sensibilità e quindi bassi limiti di rivelabilità si usa un gas di trasporto che abbia una conducibilità termica più diversa possibile da qualsiasi altra sostanza: l'idrogeno è il migliore o, eventualmente, l'elio.
- Il limite di rivelabilità è di 1 ppm, mentre la linearità va da 10^4 a 10^6 .

Rivelatore a ionizzazione di fiamma. *FID (Flame ionization detector)*

- Questo è un rivelatore di tipo distruttivo perché le sostanze eluite contenute nel gas di trasporto vengono bruciate in una microfiamma di idrogeno e aria che si estende fra due elettrodi tra i quali è applicata una differenza di potenziale di 300 V.

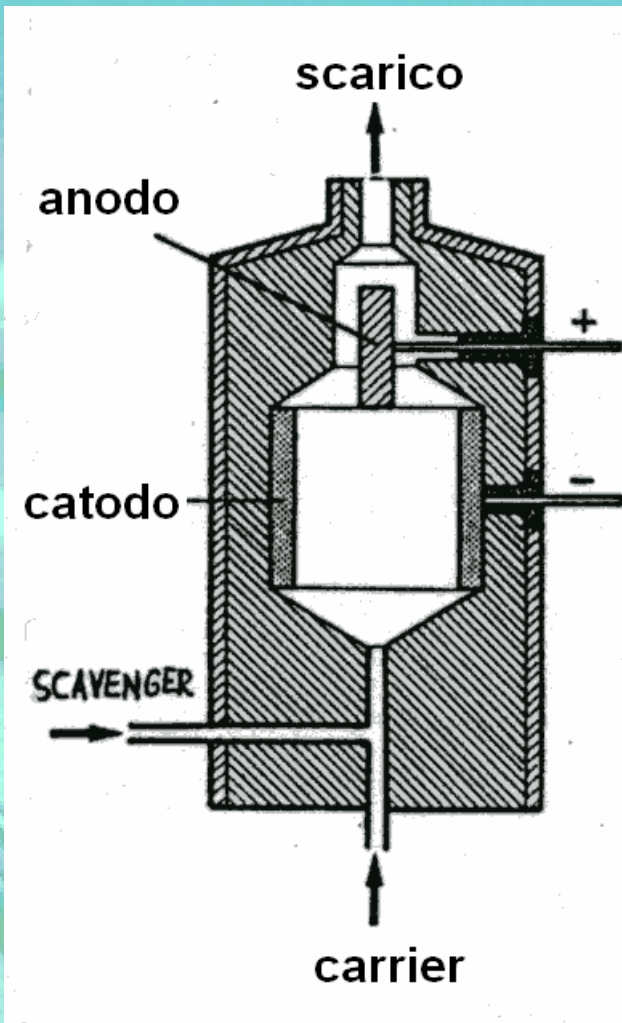




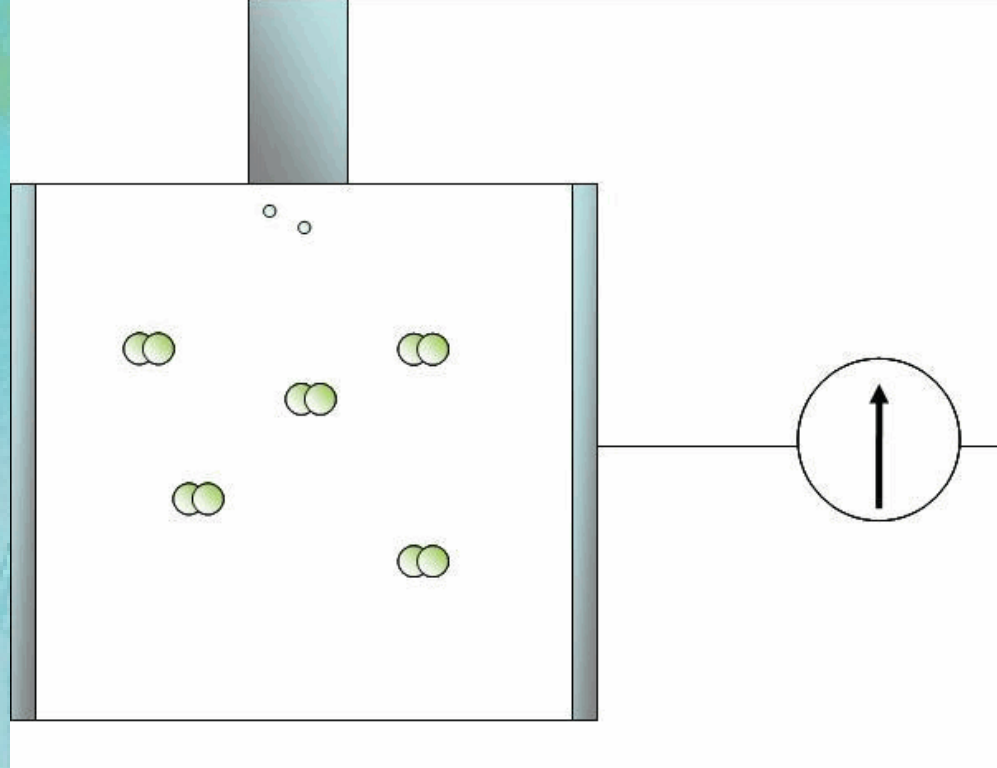
- Per effetto della combustione si originano ioni e pertanto tra gli elettrodi si manifesta un passaggio di corrente elettrica di intensità proporzionale alla quantità delle sostanze bruciate.
- Tale corrente viene amplificata e trasformata in segnale di tensione di alcuni mV.

- In presenza del solo carrier la corrente è quasi nulla, dovuta a impurezze presenti nel gas di trasporto o, più spesso, a tracce di fase stazionaria che sono trascinate via.
- Quando nella fiamma bruciano, oltre ad idrogeno, anche altre sostanze, aumenta notevolmente la ionizzazione, e di conseguenza anche la corrente.
- Questo rivelatore è poco selettivo perché sensibile a tutte le sostanze organiche, ha limite di rivelabilità da 10^{-9} a 10^{-12} g, ha linearità di risposta da 10^6 a 10^8 .
- E' insensibile solo ai gas permanenti, ad H_2S , NH_3 , SO_2 , CO_2 , CO , H_2O . Può lavorare fino a temperature di $400^\circ C$ e con qualsiasi gas di trasporto.

Rivelatore a cattura di elettroni ECD (Electron capture detector)

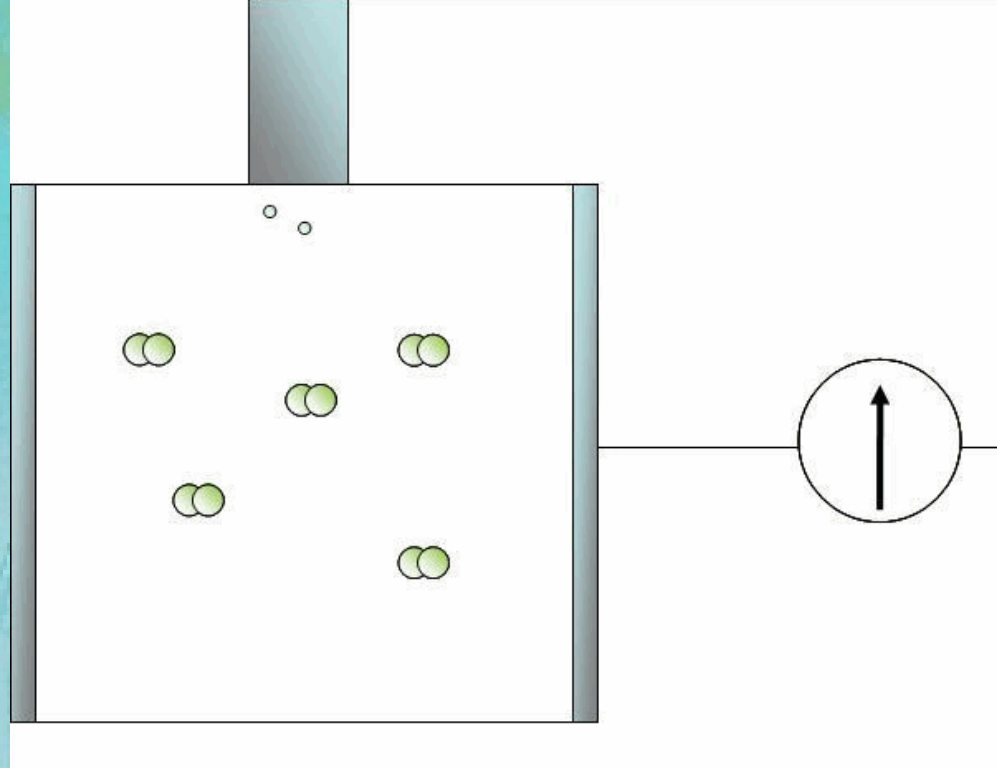


- E' un tipo di rivelatore che si basa sulla rilevazione di segnali elettrici in seguito al passaggio di gas ionizzato tra i due elettrodi.
- Il rivelatore è costituito da un catodo e un anodo.
- Il catodo è rivestito da un materiale radioattivo a bassa energia. Un tempo si usava il TiT_4 che però alle alte temperature poteva perdere trizio. Attualmente si usa il ^{63}Ni attaccato a una lamina d'oro.
- L'anodo ha forma tubolare e funge da tubo di ingresso del gas.



- Il gas di trasporto che esce dalla colonna gascromatografica e attraversa la camera viene ionizzato dai β^- emessi dal nichel.
- Si generano ioni che migrano verso i rispettivi elettrodi creando una corrente di fondo che andrà a rappresentare il valore della linea di fondo



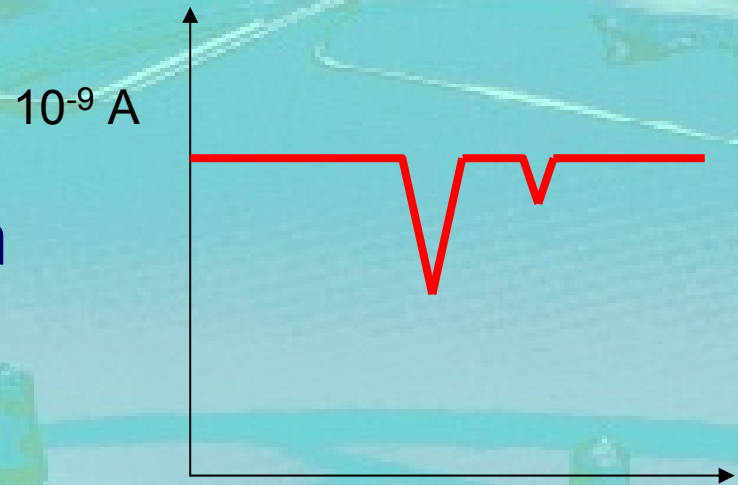


- Se nel gas di trasporto è presente una sostanza elettronegativa avviene



si formano pertanto molecole neutre che fanno calare la corrente di base.

- Per questo motivo ci troviamo di fronte a un rivelatore a risposta contraria a quella degli altri due visti: quando rivela qualcosa il segnale cala.

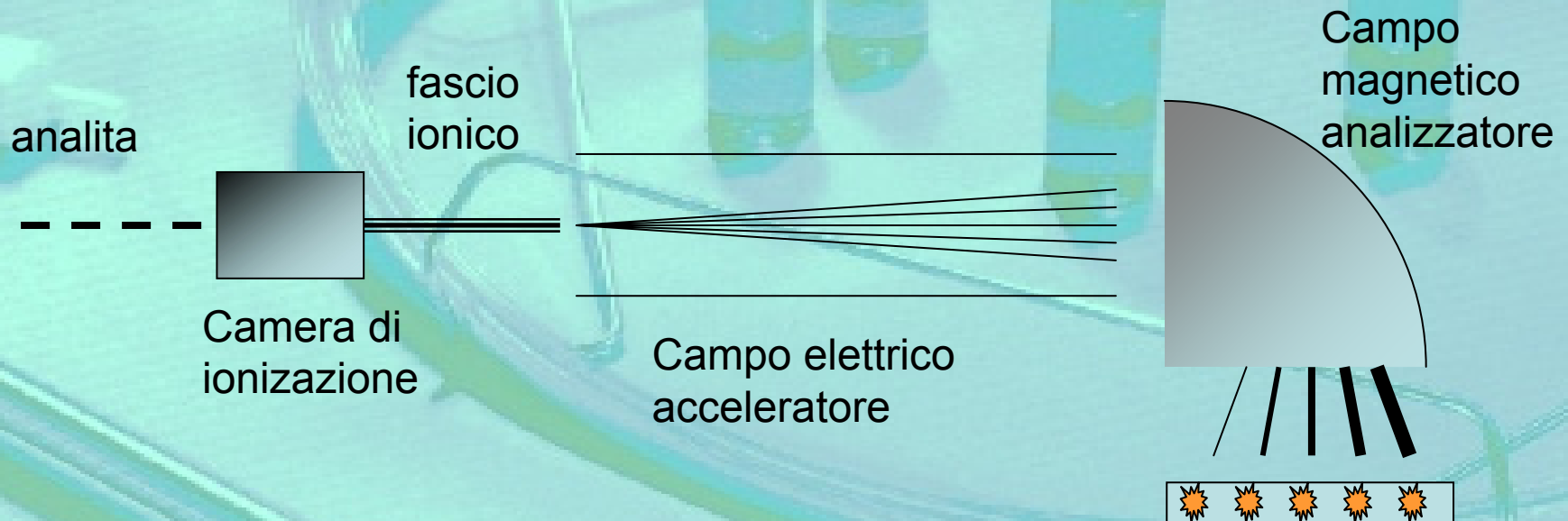


- E' molto selettivo, ha limite di rivelabilità notevole fino a 10^{-12} g , ha però linearità di risposta più contenuta da 10^3 a 10^4 .
- Tutti i parametri sono influenzati dalla ddp usata per accelerare gli elettroni emessi: se sono troppo accelerati non possono essere catturati.
- I flussi ottimali di carrier sono regolati, se diversi da quelli usati in colonna, con una valvola ausiliaria (make up)

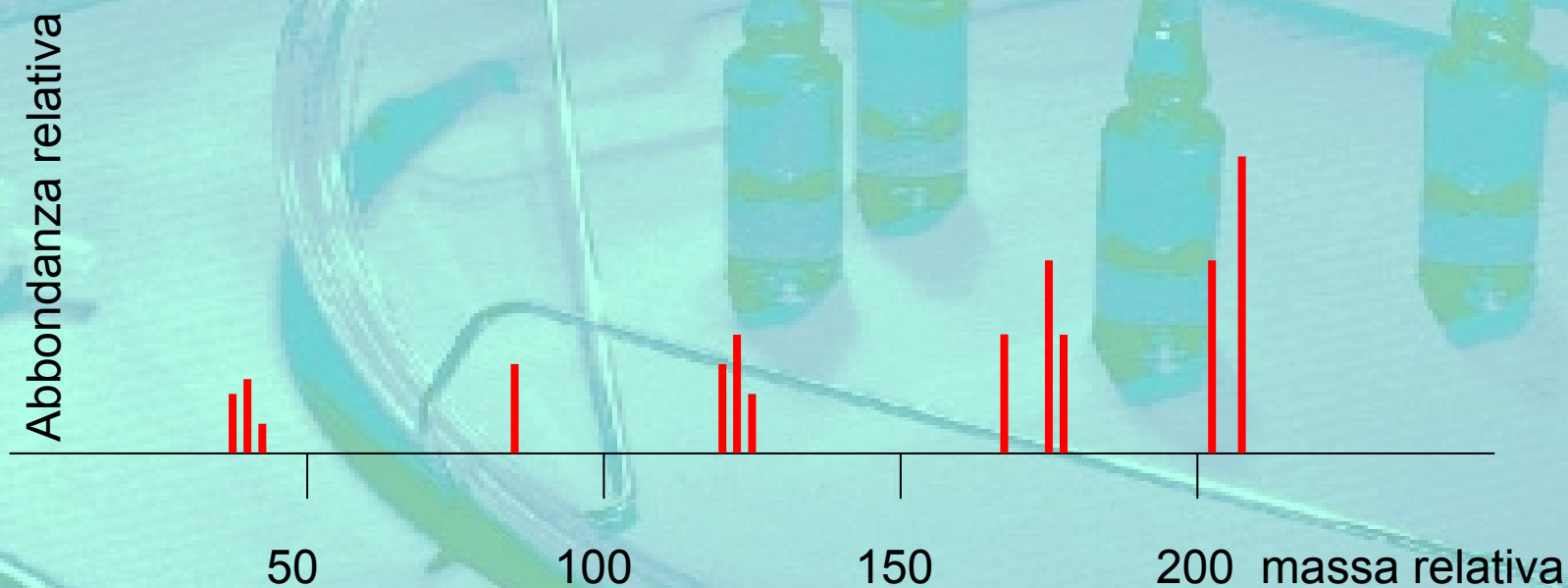
Accoppiamento GC-MS, rivelatore a quadrupolo iperbolico.

- Lo spettrometro di massa rappresenta il rivelatore ideale per la gascromatografia, perchè permette di analizzare in tempo reale i singoli picchi in uscita dalla colonna, effettuando sia un'analisi qualitativa che quantitativa, mediante il confronto dello spettro ottenuto con uno dei numerosi spettri memorizzati nella banca dati.

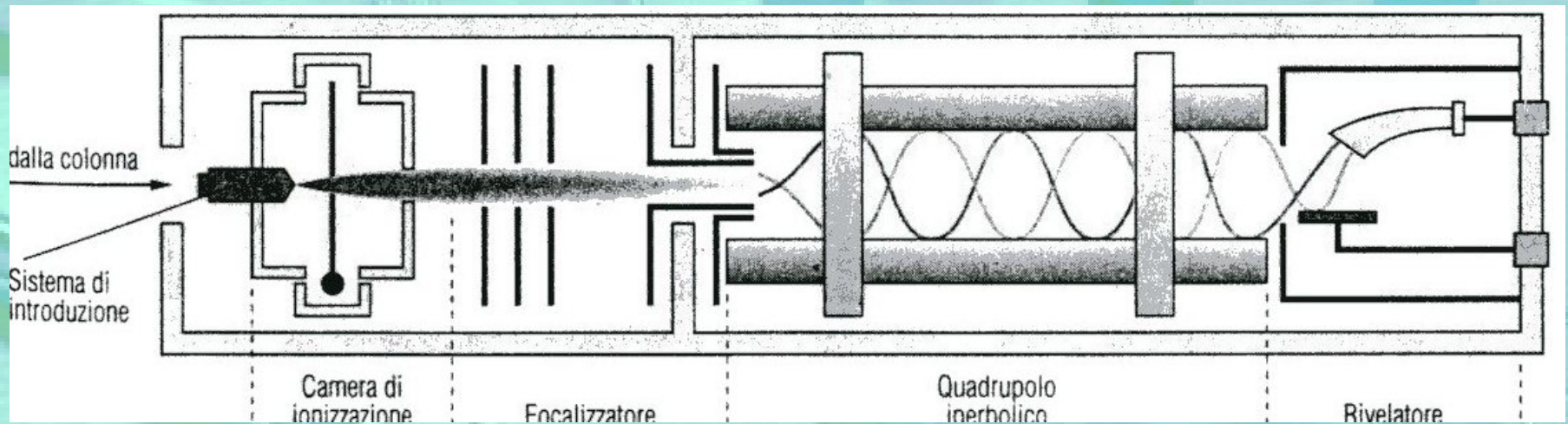
- In uno spettrometro di massa il campione viene portato in fase gassosa e le molecole vengono frammentate per bombardamento con elettroni.
- Gli ioni che si formano, accelerati da un campo elettrico posto in un campo magnetico, percorrono traiettorie diverse secondo il rispettivo rapporto carica/massa e perciò si separano tra di loro.



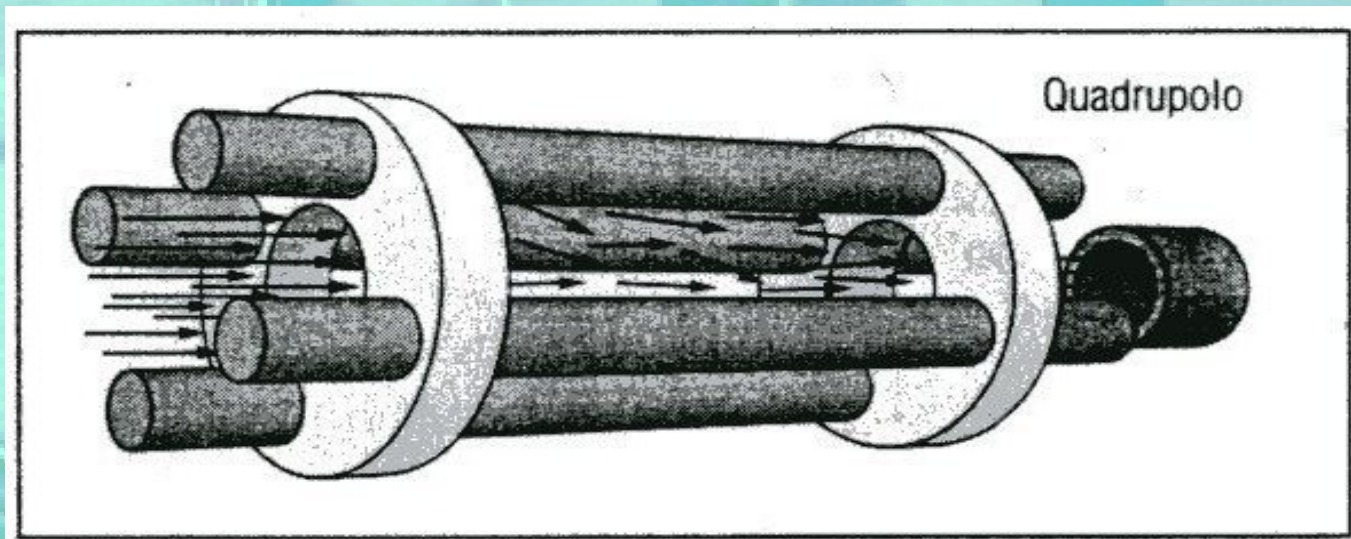
- Lo spettro (così chiamato solo perché è a righe, non perché si tratti di una spettroscopia) ottenuto consente, dall'identificazione dei frammenti in base alla loro massa atomica, di ricostruire la formula della molecola presente. Molto più semplicemente, negli strumenti moderni lo spettro viene confrontato dal computer con i numerosi spettri memorizzati nella banca dati.



- Gli spettrometri di massa più comunemente interfacciati con gascromatografi sono del tipo a quadrupolo iperbolico, molto compatti, la cui camera di ionizzazione viene collegata all'uscita della colonna con un apposito sistema che permette di eliminare il carrier.



- Questi strumenti non funzionano propriamente come uno spettrometro di massa tradizionale. Qui i frammenti passano in un analizzatore costituito da un elettrodo ad anello a cui è applicata una tensione di radio frequenza variabile. Variando il campo di radio frequenze, si ottiene espulsione selettiva dei frammenti ionizzati secondo il loro rapporto carica-massa.



- Il sistema GC-MS fornisce limiti di rivelabilità estremamente bassi, addirittura nell'ordine dei picogrammi e in alcuni casi anche dei femtogrammi.

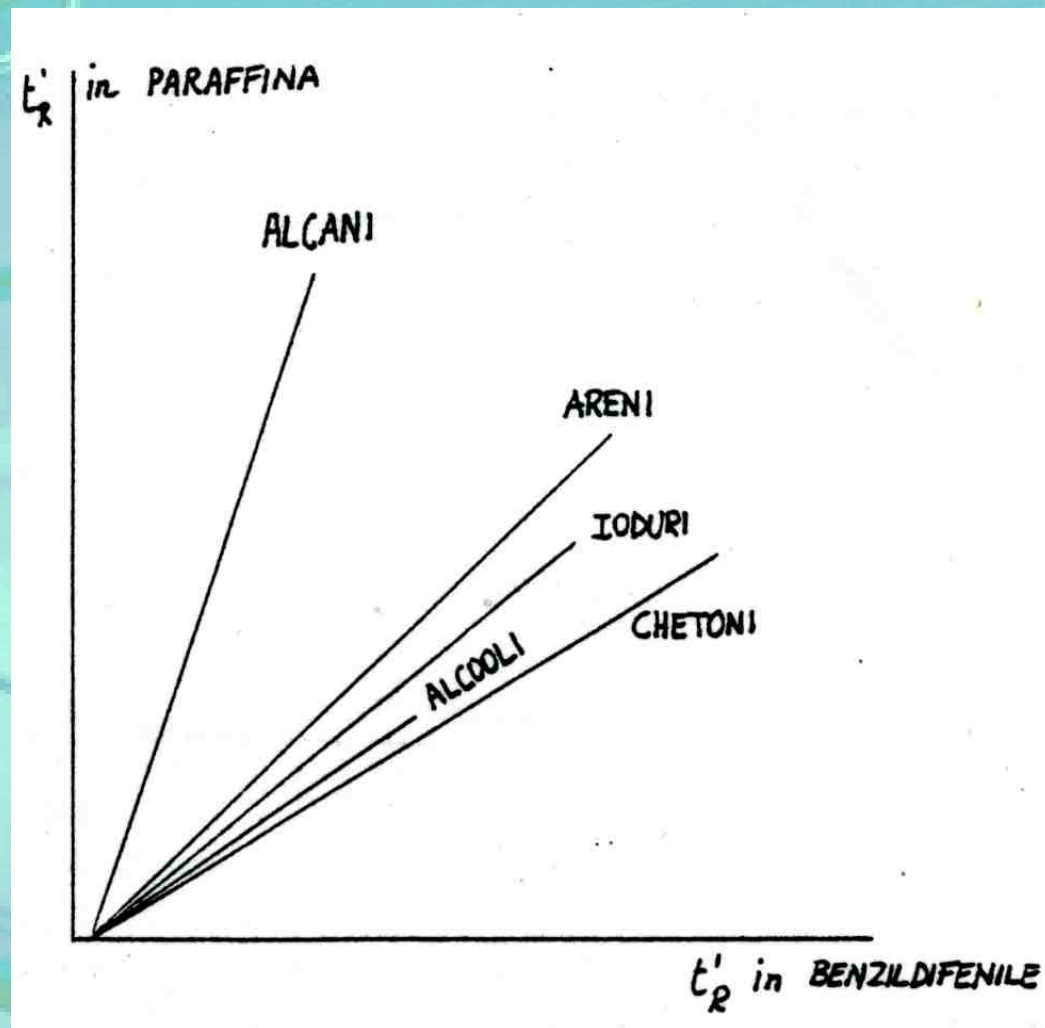
Riassumendo...

Rivelatore	Limite di rivelabilità	Intervallo di linearità	Applicazioni	Osservazioni
HWD	10^{-5} g/mL	10^4	universale	Non distruttivo; affidabile; economico
FID	10^{-11} g	10^7	quasi universale; esclusa l'acqua e alcuni gas permanenti	Distruttivo; molto affidabile;
ECD	10^{-12} g	$5 \cdot 10^2$	Alogenoderivati e composti di elementi elettronegativi	Non distruttivo; costoso; si inquina facilmente
GC-MS	10^{-12} g	10^4	universale	Costoso; grande versatilità

ANALISI QUALITATIVA

- Non è certo il campo più adatto dell'analisi gas-cromatografica.
- Il t_R' può dare delle indicazioni significative ma non probanti.
- Le serie omologhe presentano valori dei t_R' i cui log sono funzione lineare del numero di atomi di carbonio che ne compongono la catena.

- Mediante l'impiego di due diverse colonne, l'una con una fase stazionaria polare, l'altra con una fase stazionaria apolare, e mettendo in ascissa i t_R' ottenuti nel primo caso e in ordinata i t_R' ricavati nel secondo caso, si perviene a una retta per ogni serie omologa.

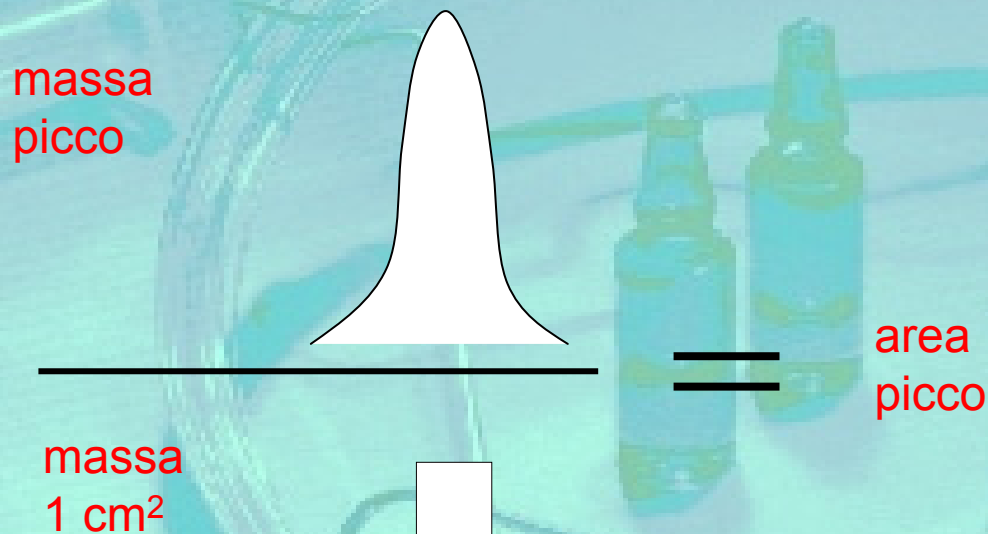


- Provando la sostanza incognita nelle due colonne di riferimento e misurandone i t_R' , si può avere l'idea di che composto si ha.
- Il modo migliore di procedere, poi, è di iniettare una certa quantità, il 10-20%, della sostanza pura nella miscela: il picco in esame risulta aumentato vi una buona probabilità di aver individuato la sostanza.
- Il procedimento si ripete con una colonna di diversa natura. Se anche in questo caso l'arricchimento fa aumentare il picco in esame, si è quasi certi di aver trovato di che sostanza si sta trattando.
- Il metodo è molto macchinoso e non sempre si riesce a identificare ogni sostanza. Ogni frazione dovrebbe essere analizzata separatamente.
- Se si ha a disposizione un gas-massa ogni problema è risolto.

ANALISI QUANTITATIVA

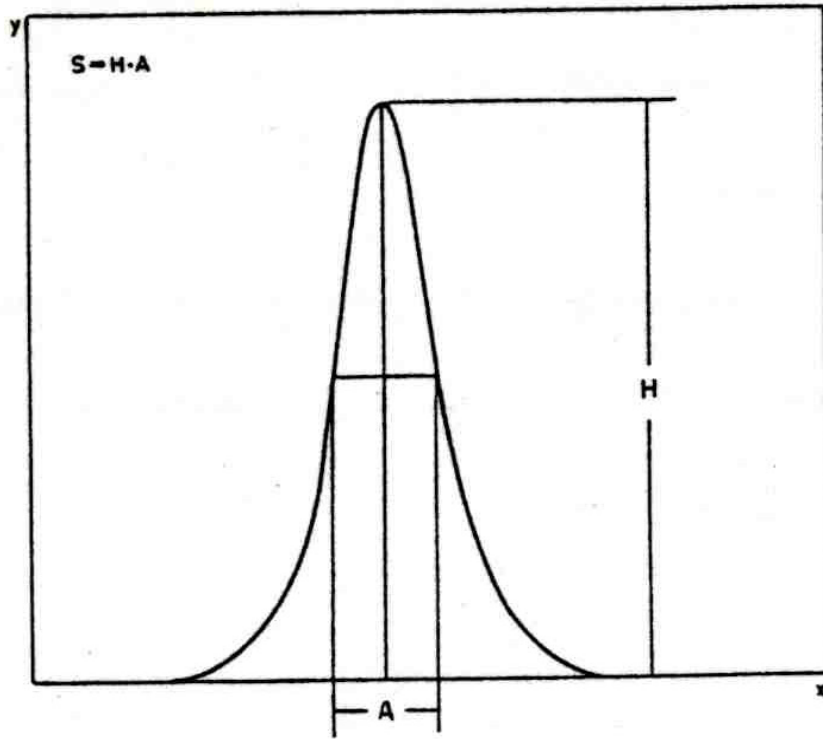
- L'analisi quantitativa cromatografica è basata sulla misura delle aree dei picchi, dalle quali, dopo opportuna elaborazione, si risale alle concentrazioni percentuali dei componenti.
- Il calcolo dell'area del picco viene fatto automaticamente dal computer che lo stampa direttamente sul grafico.
- E' necessario comunque conoscere i rudimenti del calcolo delle aree.

- Un primo modo molto semplice è quello di ritagliare il picco e pesarlo. Confrontando il peso con quello di 1 cm² della stessa carta si può ottenere l'area del picco.

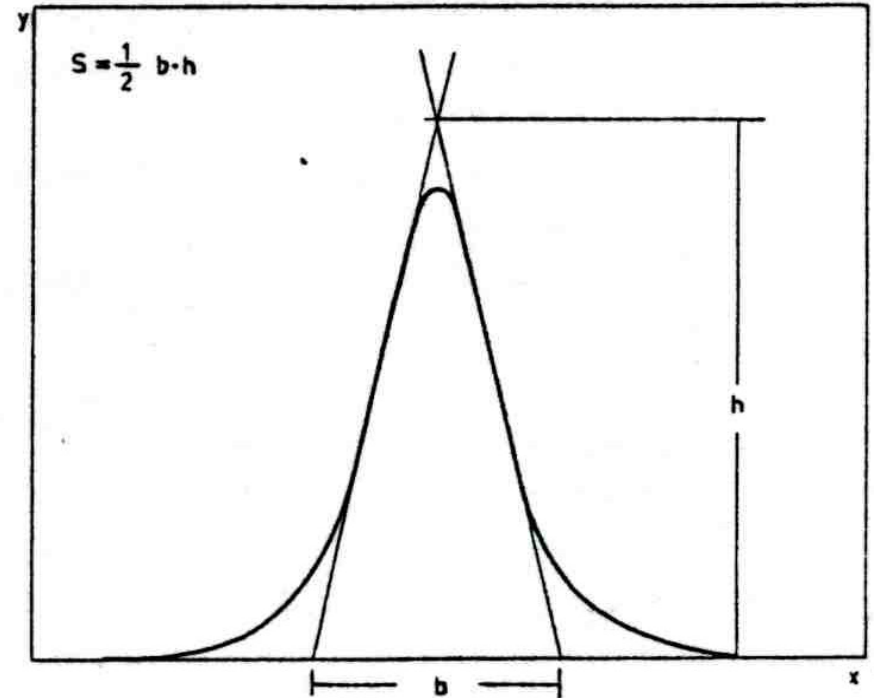


- Il metodo è fortemente influenzato dalla capacità di tagliare correttamente il picco, soprattutto quando è irregolare. Solo una persona esperta fa errori bassi (dell'ordine dell'1%!).

- Più applicato è il metodo del calcolo delle aree a partire da dati geometrici: a tale scopo il metodo della triangolazione è più usato di quello della gaussiana.



Metodo della Gaussiana.



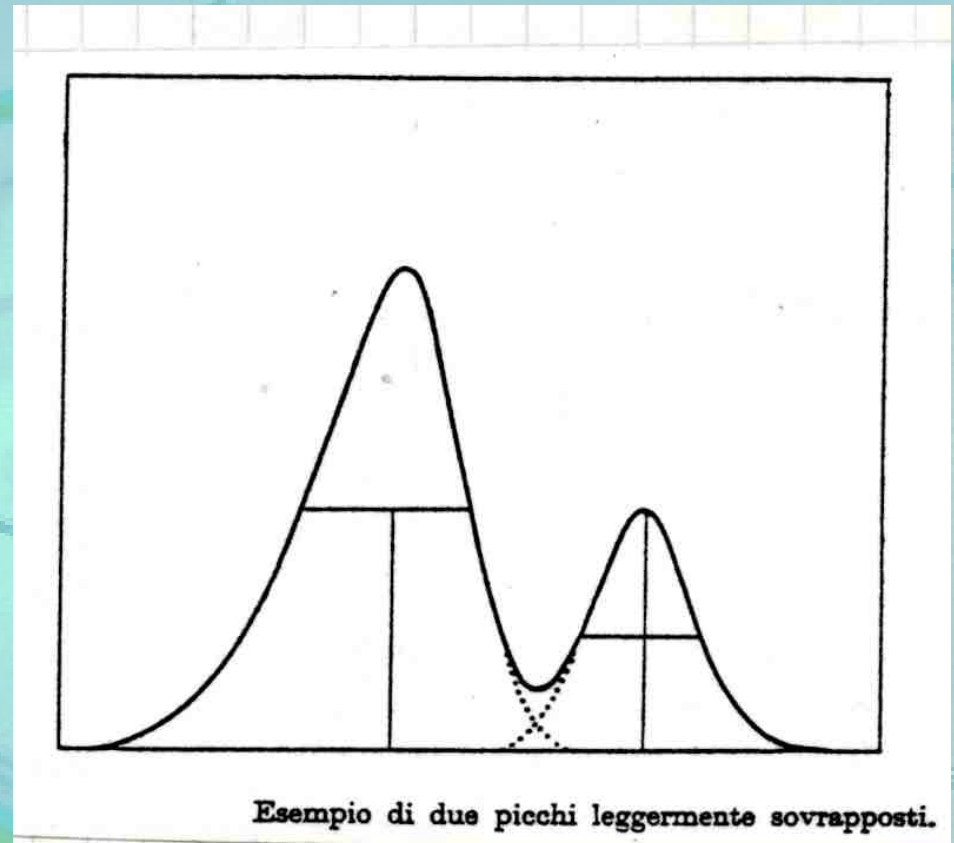
Metodo delle triangolazioni.

- E' chiaro che un esatto calcolo è strettamente legato alla pulizia del picco (simmetria e mancanza di sovrapposizioni).

- E' tuttavia molto frequente il caso di picchi non separati. In genere ci si comporta come di seguito.

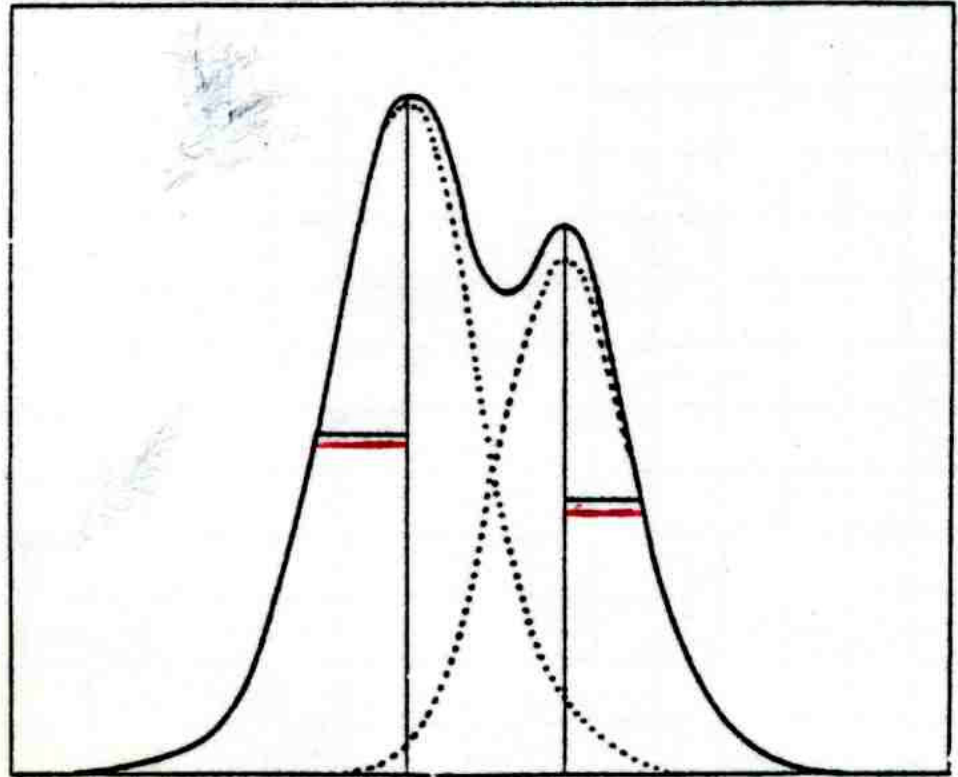
- **Picchi leggermente sovrapposti**

Li si considera separati. E' agevole trovare l'ampiezza a metà altezza e l'altezza. Si applica poi il metodo della gaussiana.

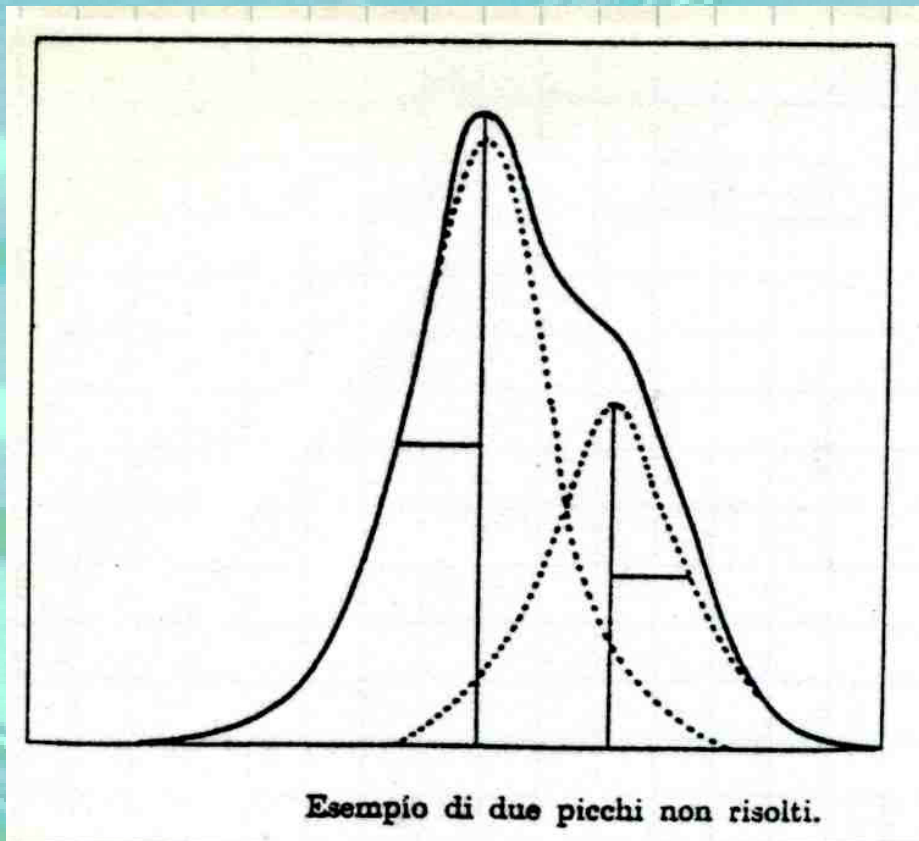


- **Picchi molto sovrapposti ma ancora risolti**

In questo caso l'ampiezza a metà altezza è facilmente ricavabile dalla semiampiezza. L'altezza deve però essere stimata da un operatore con molta esperienza. L'integrazione elettronica ricostruisce la funzione matematica del picco più grande, ne calcola l'area e la sottrae all'area totale.



Esempio di due picchi molto sovrapposti, ma ancora risolti.



- **Picchi non risolti**
Non è possibile a occhio ottenere dei valori sensati. Il computer dà in genere il valore totale e solo con programmi molto sofisticati riesce a operare la separazione.

Misura della concentrazione

- La scelta del metodo di calcolo e della procedura operativa sono diversi a seconda che si debbano determinare quantitativamente tutti i componenti della miscela oppure uno solo. Nel primo caso, infatti, è fondamentale essere certi che tutti i componenti della miscela siano separati e rivelati, mentre nel secondo caso è sufficiente che il componente che interessa fornisca un picco ben definito.

Metodo della taratura diretta

- E' possibile determinare, con questo metodo, la concentrazione del solo componente che interessa, e quindi non è necessario che siano identificabili i picchi di tutti i componenti.
- Si inietta un volume noto e preciso del campione e si registra il cromatogramma.
- Preparata, poi, una miscela a concentrazione nota del componente/i da determinare se ne inietta lo stesso volume precedente nel gascromatografo.

Partendo dalla considerazione generale che

$$S_{iS} / C_{iS} = S_{iC} / C_{iC}$$

la percentuale di campione si ottiene con:

$$C_{iC} = S_{iC} \cdot C_{iS} / S_{iS}$$

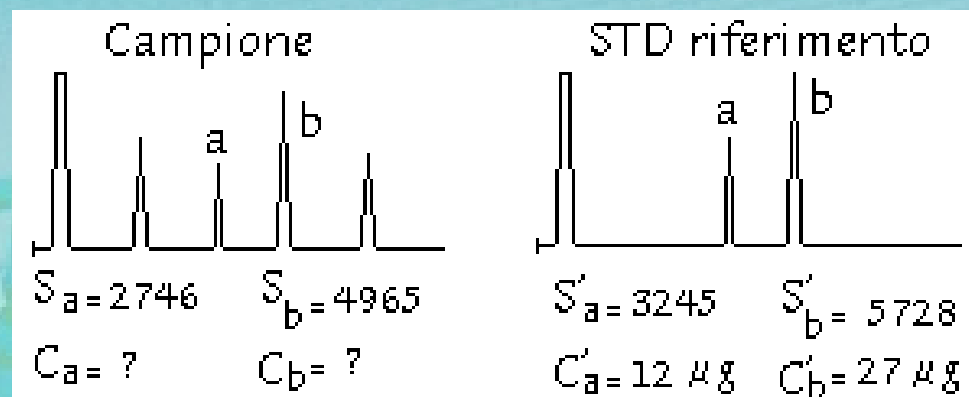
dove

C_{iC} = concentrazione del componente nel campione,

S_{iC} = area del picco nel cromatogramma del campione

C_{iS} = concentrazione nota del componente nello standard,

S_{iS} = area del picco nel cromatogramma dello standard.



Calcoli:

$$C_a = S_a \times \frac{C'_a}{S'_a} = 2746 \times \frac{12}{3245} = 10,15 \mu g$$

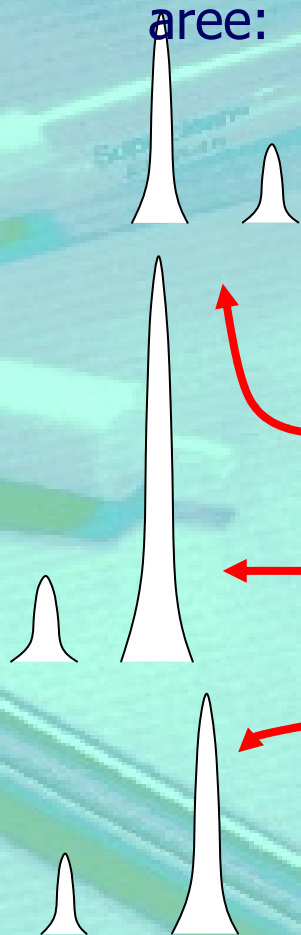
$$C_b = S_b \times \frac{C'_b}{S'_b} = 4965 \times \frac{27}{5728} = 23,40 \mu g$$

- E' importante fare in modo che le concentrazioni nello standard non siano molto diverse da quelle del campione.
- Il metodo ha il vantaggio di non obbligare a "lavorare" su tutti i componenti della miscela, come invece accade per la normalizzazione interna.
- Il principale inconveniente risiede nel fatto che occorre una grande accuratezza e, soprattutto, riproducibilità, nel misurare il volume da iniettare.
- Si consiglia quindi di effettuare una serie di iniezioni, sia della miscela che dello standard e di calcolare la medie delle aree.
- Le iniezioni vanno effettuate entro un breve intervallo di tempo per evitare le deviazioni causate da variazioni ambientali o strumentali.

Standardizzazione interna

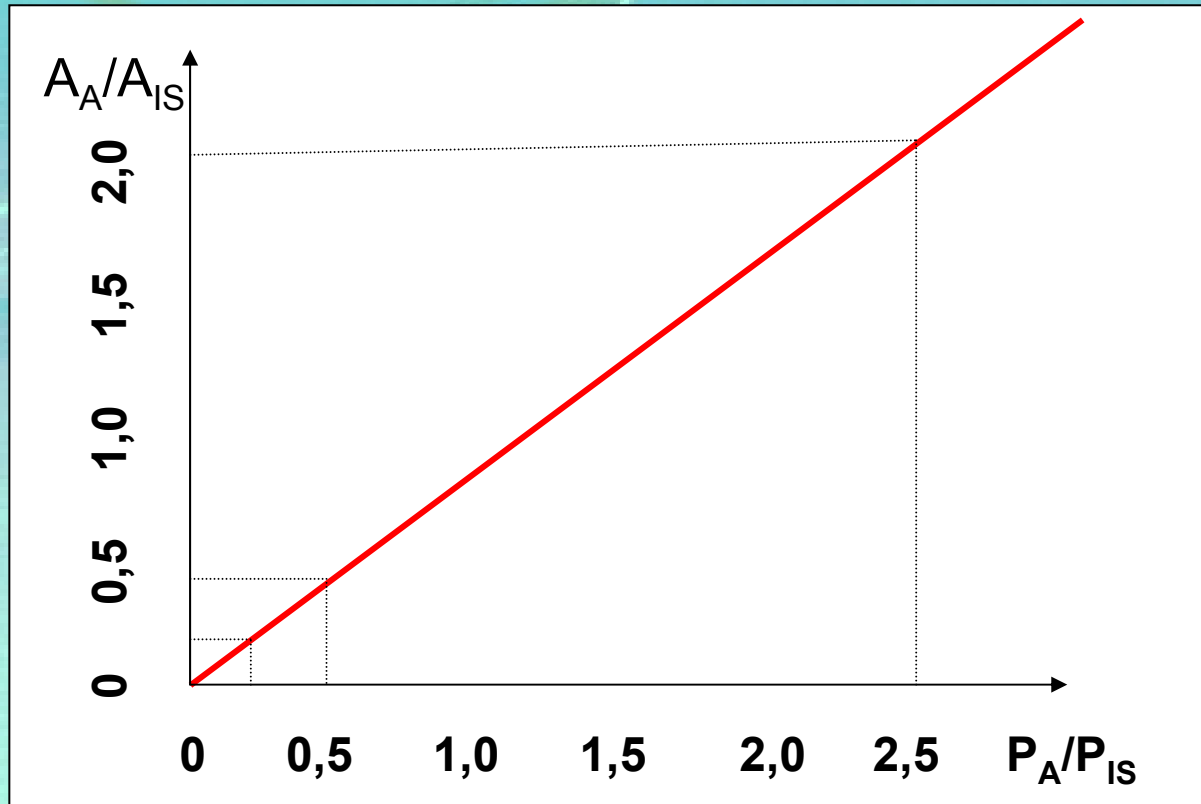
- Il metodo consiste nel preparare una serie di soluzioni standard utilizzando due composti, dei quali uno deve essere il componente che interessa nella miscela da analizzare. L'altro invece è un composto il quale fa da standard interno e deve rispettare una serie di requisiti:
 - non essere presente nella miscela da analizzare;
 - essere ben risolto dagli altri componenti;
 - avere un t_R simile a quello della sostanza che ci interessa;
 - avere una concentrazione simile a quella della sostanza ed essere strutturalmente simile ad essa, in modo da dare un picco di area analoga;
 - non contenere impurezze;
 - non reagire col campione.

- Si preparano più soluzioni, per esempio tre, contenenti tutte A (il composto da determinare) IS (lo standard interno),
In ciascuna di esse sono noti i rapporti di peso P_A/P_{IS} con cui sono state preparate.
Per esempio, nelle tre soluzioni si siano ottenuti i valori sottostanti di aree:



	Area A mm ²	Area IS mm ²	P_A mg	P_{IS} mg	A_A/A_{IS}	P_A/P_{IS}
Soluzione 1	40	20	250	100	2,0	2,5
Soluzione 2	20	100	125	500	0,2	0,25
Soluzione 3	16	40	100	200	0,4	0,5

- Si riportano in un grafico i valori trovati per i rapporti tra le aree in funzione dei rispettivi rapporti in peso.



- Si procede poi aggiungendo una quantità nota dello standard interno (Q_{IS}) al campione. Dal cromatogramma della miscela così ottenuta si misura il rapporto A_A/A_{IS} e attraverso il grafico si risale al relativo rapporto in peso P_A/P_{IS} .

- Conoscendo la quantità di IS introdotto nella miscela, la quantità di A sarà data dalla relazione:

$$Q_{IS} \cdot \frac{P_A}{P_{IS}} = Q_A$$

in cui

P_A/P_{IS} = rapporto ottenuto dalla retta di taratura

Q_{IS} = peso di IS aggiunto

- Se, per esempio, sono stati introdotti 200 mg di IS nella miscela, e il rapporto tra le aree che si ricava dal suo cromatogramma vale 1, dalla retta precedente si può vedere che il rapporto P_A/P_{IS} vale 1,25. La quantità di sostanza A sarà data da

$$200 \cdot 1,25 = 250 \text{ mg}$$

e quindi la concentrazione originaria nel campione sarà:

$$\frac{\frac{P_A}{P_{IS}} \cdot Q_{IS}}{V_C} = C_A$$

dove

V_C = volume di campione al quale è stato aggiunto lo standard

Cromatografia dello spazio di testa HSGC

- Quando si devono analizzare tracce di composti volatili in campioni solidi o in una grande massa di solvente la tecnica più adatta a questo scopo è la gascromatografia dello spazio di testa.
- Essa consiste nell'iniettare in colonna il vapore che si trova in equilibrio termodinamico con il campione da analizzare, all'interno di un sistema chiuso costituito da un contenitore chiuso ermeticamente detto vials.

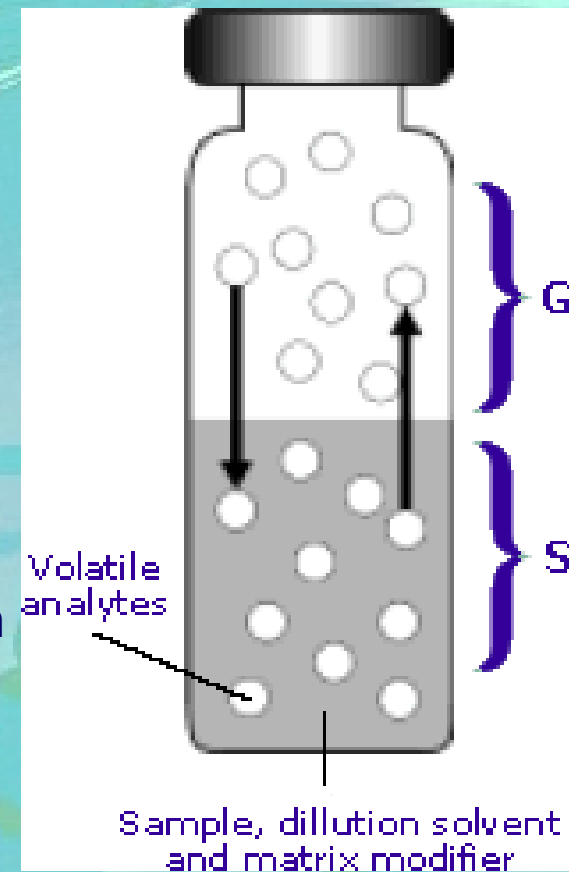


- Ciò permette di lavorare su una frazione arricchita delle specie chimiche ad elevate pressioni di vapore, senza gli inconvenienti che possono scaturire dalla iniezione di sostanze non volatili o di grandi masse di solvente.
- Si realizzano così analisi molto precise e riproducibili, a patto però di *controllare rigorosamente* le condizioni operative.
- Considerando il caso di una soluzione in equilibrio con il suo vapore, la concentrazione di un componente volatile nello spazio di testa è regolato, in condizioni ideali dalla legge di Raoult:

$$p = x \cdot p^0$$

dove p rappresenta la pressione parziale del componente nella fase vapore e dunque la sua concentrazione, p^0 è la pressione del vapore del componente puro alla temperatura a cui si trova il vials, mentre x è la sua frazione molare nella soluzione.

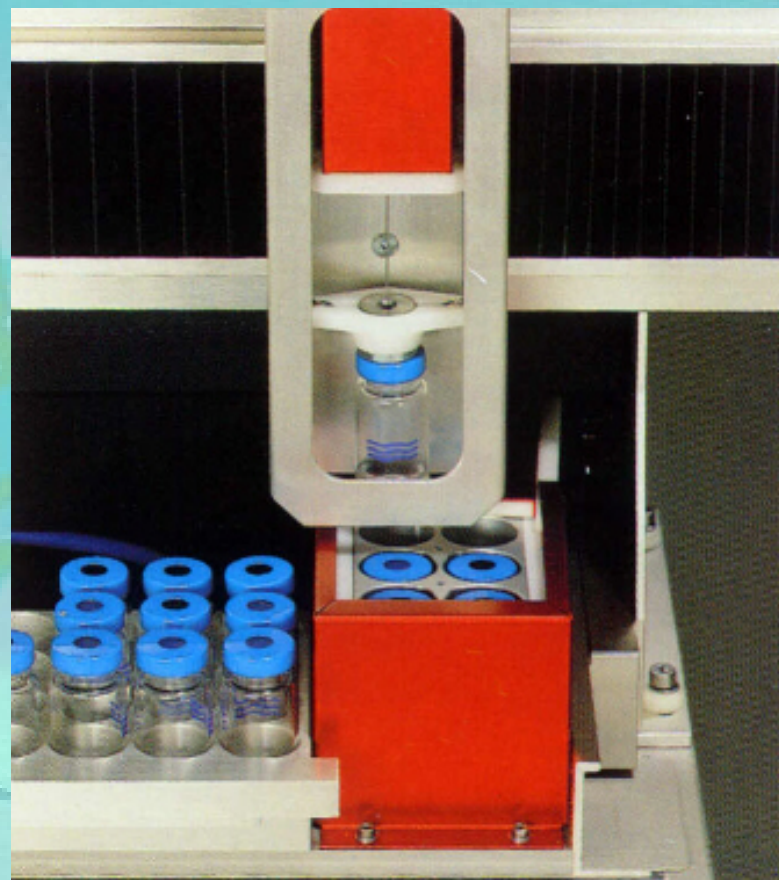
- Procedendo all'analisi gascromatografica dello spazio di testa si otterrà un cromatogramma il cui picco che ci interessa avrà una superficie S , proporzionale alla concentrazione della sostanza nel vapore e quindi nella fase liquida.



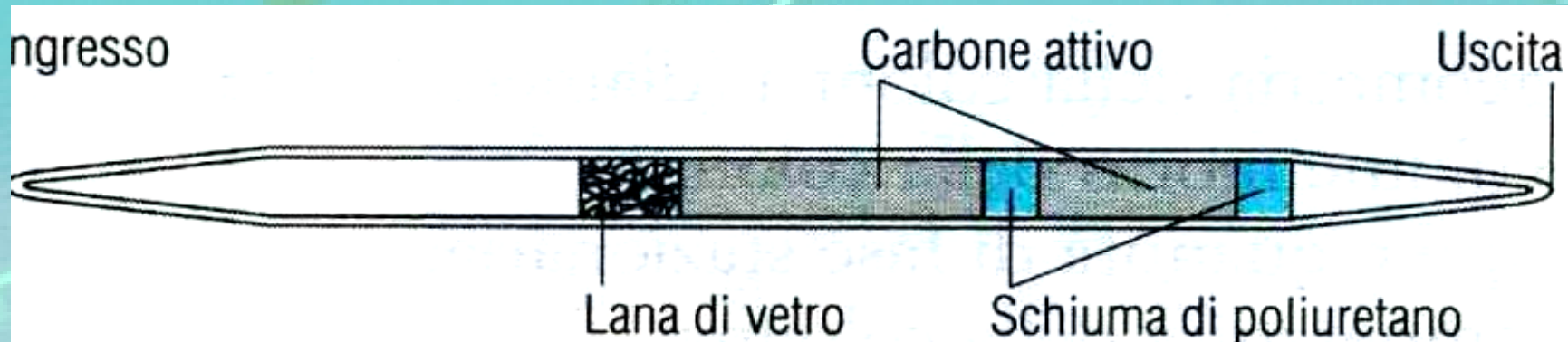
- La tecnica dello spazio di testa consente di individuare tracce di composti volatili a livello di ppb o anche di ppt (parti per trilione, 10^{-3} ppb), perché la fase di vapore è ovviamente più ricca, nel composto volatile della soluzione originaria. In sostanza, lo spazio di testa può essere visto dunque come un metodo di preconcentrazione.
- Per esaltare la sensibilità del metodo si può agire in due modi che possono anche venire usati contemporaneamente:
 - innalzare la temperatura: infatti la pressione di vapore p^0 di una sostanza è proporzionale alla sua temperatura. Minimi incrementi di temperatura provocano un sensibile aumento della pressione di vapore.
 - introduzione in soluzione di opportuni elettroliti: In pratica però non risulta conveniente innalzare la temperatura al di sopra degli $80\text{ }^{\circ}\text{C}$, valida alternativa è però l'introduzione in soluzione di elettroliti che agiscono sul coefficiente di attività aumentando la pressione del vapore all'equilibrio, anche fino a cinque volte.

Tecnica operativa della gascromatografia in spazio di testa

- **Campionamento:** E' la fase più delicata perché è facile incorrere in errori anche grossolani, le soluzioni devono essere preparate e mantenute in contenitori ermetici completamente pieni, non è inoltre opportuno utilizzare tappi di gomma.
- **Trasferimento delle soluzioni:** Non deve mai essere eseguito con la pipetta ma bensì con una siringa di adatta capacità.
- **Chiusura del vial:** La chiusura va effettuata con appositi dispositivi che assicurino la perfetta tenuta, il tappo deve essere costituito da un adatto materiale inerte, quale può essere il teflon o l'alluminio, la semplice gomma non è indicata per questi scopi.
- **Termostatazione del vial:** Deve essere eseguita con la massima precisione, di solito la temperatura va dai 40°C agli 80°C.
- **Prelievo e iniezione del campione:** Agli inizi questa tecnica prevedeva l'impiego di siringhe o valvole per gas, questi sistemi offrivano però più svantaggi che vantaggi, (Condensazione sulle pareti della siringa ecc.) oggi il campionamento è completamente automatico



Preconcentrazione per adsorbimento



- Il metodo di adsorbimento/desorbimento (purge and trap) è il più sensibile per l'analisi dei campioni gassosi estremamente diluiti (come per esempio la determinazione dei solventi nell'aria).
- In una prima fase il campione viene fatto passare per un certo tempo attraverso una trappola costituita da una fiala contenente carbone attivo venfondo desorbite e sottoposte ad analisi gascromatografica.
- Il desorbimento può essere effettuato in due modi:
- innalzando la temperatura:
- per estrazione con solvente e analisi della soluzione.