

## CROMATOGRAFIA E GASCROMATOGRAFIA

### (lezione 3 e lezione 4)

Il nome cromatografia significa *segno colorato* e tale nome venne usato poiché le prime analisi venivano eseguite con sostanze pigmentate. Tale tecnica consiste nella separazione di sostanze presenti in una miscela, per cui è una tecnica separativa e non una tecnica analitica. La separazione cromatografia può avvenire sfruttando due principi chimico-fisici: l'adsorbimento e la ripartizione.

**L'adsorbimento** è un fenomeno chimico per cui alcuni tipi di solidi hanno la proprietà di adsorbire (= molecole o atomi formano un legame chimico di tipo covalente o instaurano un'interazione di tipo fisico mediante legami di Van der Waals) in superficie molecole di liquidi o di gas. L'adsorbimento avviene perché sulla superficie di questi solidi ci sono atomi o molecole con cariche non completamente sature. Molecole polari vengono così adsorbite dal solido. I legami che tengono unite le molecole con i solidi adsorbenti sono legami chimici deboli come legami di Van der Waals, legami dipolo-dipolo, legami ad idrogeno. L'adsorbimento sarà più forte a seconda del tipo di legame che si forma.

La **ripartizione** è quel fenomeno per cui un soluto si ripartisce fra due solventi non miscibili fra loro.

La cromatografia è oggi utilizzata anche come tecnica analitica, in quanto, una volta che le sostanze sono state separate, possono essere determinate sia quantitativamente che qualitativamente.

Esistono quattro tipi di cromatografia, distinti in base ai materiali e agli strumenti usati:

- Cromatografia su colonna
- Cromatografia su carta
- Cromatografia su strato sottile
- Gas-cromatografia

Il meccanismo con cui avviene la cromatografia consiste nella ripartizione tra due fasi di sostanze presenti in un miscuglio. La **fase fissa** o **fase stazionaria** può essere un solido o un liquido; la **fase mobile** contiene il miscuglio da separare, scorre continuamente sulla fase fissa e può essere un liquido o un gas. Le sostanze contenute nel miscuglio si ripartiscono tra le due fasi. Se la fase fissa è un solido, tale solido deve essere ridotto in uno stato poroso (polvere) in modo da permettere il passaggio attraverso di esso della fase mobile. Se la fase fissa è un liquido, per aver la possibilità di far scorrere attraverso di esso la fase mobile senza avere fenomeni di rimescolamento, si fa uso di

un materiale inerte ridotto in polvere e bagnato con il liquido che costituisce la fase fissa; si ha quindi una fase fissa liquida supportata da un solido inerte (liquido poroso).

Se la fase fissa è un solido, si sfrutta il principio dell'adsorbimento. Durante il passaggio della fase mobile, contenente il miscuglio da separare, attraverso la fase fissa si ha il passaggio di parte di ogni soluto dalla fase mobile alla fase fissa.

Se la fase fissa è un liquido, la separazione della sostanza fra le due fasi avviene in base alla ripartizione, per cui le sostanze contenute nel miscuglio si ripartiscono tra la fase fissa e la fase mobile.

Il processo cromatografico avviene nella **colonna cromatografia**, che ha sempre la funzione di contenere/sostenere la fase fissa. Tale colonna può essere una colonna vera e propria, chiusa in fondo con un setto poroso (o lana di vetro) e riempita con la fase fissa, o può essere un tubo di vetro o di metallo con diametro molto piccolo e lunghezza di molti metri. In alcuni casi la colonna cromatografica è sostituita da una striscia di carta da filtro o una lastrina di vetro ricoperta di uno strato sottilissimo e omogeneo di un solido poroso. La carta da filtro e lo strato di materiale poroso possiedono capillari sottilissimi che possono essere rivestiti internamente della fase fissa.

La fase mobile scorre sulla o attraverso la fase fissa nella colonna per gravità. Se la colonna è un sottile tubo di metallo e la fase mobile un gas, lo scorrimento della fase mobile si può realizzare creando una differenza di pressione tra l'entrata e l'uscita del tubo.

La separazione delle sostanze avviene durante il loro passaggio attraverso la fase fissa della colonna, poiché tale passaggio avviene con velocità diverse a seconda delle loro proprietà chimico-fisiche e della loro struttura molecolare. Quando un miscuglio, trasportato dalla fase mobile, entra in colonna, le sostanze sono tutte insieme, dopo un certo tempo, invece, le sostanze si separano.

L'adsorbimento dipende soprattutto da quattro fattori:

1. suddivisione del solido adsorbente: l'adsorbimento è un fenomeno superficiale, per cui maggiore è la superficie del solido adsorbente e maggiore è l'entità dell'adsorbimento;
2. polarità delle sostanze da separare: è un fenomeno elettrostatico, per cui dipende dalla polarità delle sostanze che vengono adsorbite. Maggiore è la polarità della sostanza che viene adsorbita e maggiore risulta l'adsorbimento;
3. temperatura: temperature elevate ostacolano l'adsorbimento perché l'alta energia cinetica rende più difficile la formazione dei legami;

4. pressione: pressioni elevate favoriscono l'adsorbimento, poiché aumentando la pressione aumenta la concentrazione e quindi la possibilità di formazione dei legami.

Fissata la pressione, la temperatura e le dimensioni del solido adsorbente, l'adsorbimento dipende dalla polarità della sostanza. La sostanza più polare attraverserà meno velocemente la colonna perché sarà più facilmente e più fortemente adsorbita. Quindi le velocità con cui le sostanze scorrono lungo la fase fissa adsorbente sono inversamente proporzionali alla polarità della sostanza. Se si vogliono separare sostanze che hanno all'incirca la stessa polarità (sostanze organiche come acidi grassi) la separazione nella colonna cromatografica avviene in funzione del peso molecolare e precisamente: minore è il peso molecolare e maggiore è la velocità con cui la sostanza scorre nella colonna.

Nella cromatografia di adsorbimento la fase fissa è un solido e quella mobile può essere un gas o un liquido. Si distinguono quindi una cromatografia di adsorbimento solido-liquido e una cromatografia di adsorbimento solido-gas.

La ripartizione è la separazione di un soluto fra due solventi non miscibili tra loro; è regolata dalla **legge di Nernst**, che afferma che a temperatura costante è costante il rapporto tra le concentrazioni di un soluto in due solventi non miscibili tra loro. Se abbiamo un solvente A e un solvente B a T costante, avremo  $C_a/C_b = K$ , dove K è una costante che è detta **coefficiente di ripartizione**.

Nella cromatografia i due solventi sono quelli che costituiscono la fase fissa e la fase mobile per cui la legge di Nernst diventa  $C_f/C_m = K$  e  $C_f = KC_m$ . Graficamente si ottiene una retta con pendenza K. Dato che il rapporto è costante a temperatura costante, la retta del grafico è detta **isoterma di ripartizione**. Se varia la temperatura varia anche la pendenza della retta, che indica la solubilità della sostanza nelle due fasi. La retta di ripartizione tende a diventare una curva oltre una certa concentrazione, ovvero K varia e quindi la pendenza della retta. Se varia la pendenza, vuol dire che varia il valore di K e quindi il rapporto tra la concentrazione della fase fissa e la concentrazione della fase mobile non è più costante. Ciò accade quando la ripartizione non è più efficiente. Il valore del coefficiente di ripartizione dipende da tre fattori:

- 1) temperatura,
- 2) coppia fase fissa - fase mobile,
- 3) tipo di soluto.

Se teniamo fissa la temperatura e la coppia di solventi, il valore di K dipende solo dal tipo di soluto. Quindi le sostanze scorreranno nella colonna con velocità diverse, essendo il valore di K diverso da sostanza a sostanza. Le sostanze più solubili nella fase mobile saranno trascinate più velocemente, mentre le sostanze che sono più affini alla fase fissa scorreranno nella colonna più lentamente.

La facilità della separazione delle sostanze dipende dalla distanza tra le loro isoterme di ripartizione e quindi dalla differenza del valore di  $K$ ; se le isoterme sono molto vicine, le sostanze si separeranno difficilmente. In questi casi si può agire sui fattori dai quali dipendono i valori di  $K$  e cioè temperatura e fasi. La scelta della temperatura e delle fasi si basa su prove sperimentali.

Nella cromatografia di ripartizione la fase fissa è sempre un liquido e la fase mobile può essere un liquido o un gas. Si distinguono quindi una cromatografia di ripartizione liquido-liquido e una cromatografia di ripartizione liquido-gas.

Durante la separazione le sostanze si dispongono nella colonna in modo caratteristico. La zona di colonna dove si trova raccolta la sostanza già separata si chiama **banda cromatografica**. Se la separazione è efficiente, la banda cromatografica è stretta; nel caso di un processo ideale, la banda cromatografica presenta una zona di massima concentrazione nella parte centrale e due zone periferiche con concentrazioni decrescenti in maniera simmetrica da entrambe le parti.

La separazione della sostanza nella banda cromatografica può essere rappresentata graficamente, riportando in ordinate la concentrazione della sostanza e in ascisse la distanza della banda cromatografica dall'inizio della colonna o una grandezza proporzionale a questa distanza (per esempio il tempo trascorso dalla introduzione della sostanza nella colonna e il momento in cui la banda cromatografica si trova nel punto scelto), otteniamo (nel caso ideale) un grafico costituito da una campana perfettamente simmetrica (che rispecchia i gradienti di concentrazione che ci sono nella banda cromatografica). Questo grafico si chiama **cromatogramma**. Il tratto di curva a campana rappresenta la banda cromatografica ed è detto **picco cromatografica della sostanza**. Il cromatogramma di una miscela di sostanze presenterà tanti picchi quante sono le sostanze separate, con ciascun picco corrispondente a una sostanza separata. Il segmento AB tagliato sulla linea di base dalle due tangenti si chiama **ampiezza del picco**. Il segmento CH rappresenta l'altezza del picco. Se la cromatografia è ideale otteniamo un picco regolare.

Una cromatografia può non essere efficiente per varie ragioni:

1. il tempo in cui fase fissa e fase mobile entrano in contatto non è sufficiente (fase mobile scorre troppo velocemente) o è troppo (fase mobile scorre troppo lentamente) per il raggiungimento dell'equilibrio; come conseguenza si ha rispettivamente che non si raggiunge l'equilibrio o che la fase fissa si satura;
2. la banda cromatografica ha una diffusione longitudinale non regolare, per cui la zona centrale presenta una concentrazione della sostanza più elevata rispetto alle due zone laterali;
3. le particelle della sostanza da separare percorrono la colonna in modo irregolare;

4. saturazione di una delle due fasi; di solito è la fase fissa. Se le sostanze trasportate dalla fase mobile sono in quantità troppo elevata, la fase fissa può non essere sufficiente a separare tutte le molecole. Tale problema si risolve iniettando quantità di sostanza molto piccole (frazioni di microlitri).

La **gas-cromatografia** richiede l'uso di uno strumento, il **gascromatografo**. Le parti essenziali di un gascromatografo sono l'**iniettore** (camera di vaporizzazione), la camera termostata (**forno**) contenente la **colonna gascromatografica**, il **rivelatore** (*detector*); esternamente si trovano il computer, le bombole contenenti i gas necessari, il misuratore di pressione.

La gascromatografia serve per separare miscele gassose e miscele liquide o solide facilmente vaporizzabili, per cui le sostanze da esaminare devono avere una tensione di vapore elevata, perché devono essere allo stato gassoso quando entrano nella colonna gascromatografica. Il nome deriva dal fatto che la fase mobile è sempre un gas, che è detto **gas di trasporto** (*carrier gas*). Il trasporto di una sostanza all'interno della colonna si dice **eluizione**. Una volta vaporizzate, le sostanze da separare sono trasportate all'interno della colonna, dove si separano per ripartizione e escono dalla colonna separate e una alla volta. Alla fine della colonna è posto un rivelatore che ha la funzione di identificare e quantificare le sostanze in uscita; ad esso è collegato un computer che riporta graficamente il cromatogramma.

Il gas di trasporto deve avere alcune caratteristiche, ovvero bassa densità, deve essere inerte, puro e assolutamente privo di acqua (l'acqua è molto dannosa in quanto può saturare la fase fissa). I gas di trasporto comunemente usati sono l'elio, l'idrogeno, l'azoto, l'argon. Il gas scorre nella colonna per differenza di pressione e il gradiente di pressione non deve essere né troppo elevato né troppo basso, altrimenti la cromatografia potrebbe risultare inefficiente; di solito la pressione in testa alla colonna è mantenuta a 1,3 atm e la pressione all'uscita a 1 atm. Un setto di gomma (silicone) permette di iniettare il campione nella camera di vaporizzazione o iniettore mediante una iniezione effettuata con una siringa per microvolumi. La sostanza deve essere iniettata nell'iniettore rapidamente e tutta insieme, in quanto deve essere subito vaporizzata. A tale scopo l'iniettore è mantenuto a una temperatura costante e tale da permettere l'evaporazione totale di tutti i componenti da separare (es.:  $T = 200^{\circ}\text{C}$ ); non deve essere troppo alta per evitare che le sostanze organiche subiscano il fenomeno di cracking (riconoscibile perché il cromatogramma presenta tanti piccoli picchi all'inizio della corsa), né troppo bassa per non diminuire l'efficienza della cromatografia.

La colonna gascromatografica può essere di un metallo (acciaio, rame) o di vetro; se sono molto lunghe (30-60 m), sono avvolte su se stesse. La parete della colonna costituisce il supporto per la

fase fissa. La colonna deve essere termostata poiché la ripartizione è legata alla temperatura. Nella colonna le sostanze devono rimanere allo stato di vapore. La temperatura della colonna viene stabilita in base alla media delle temperature di ebollizione dei componenti la miscela. Se la miscela è costituita da sostanze con temperature di ebollizione molto diverse tra loro, si programma la temperatura del forno come segue: mantenere una  $T$  iniziale pari alla media delle  $T$  di ebollizione delle sostanze bassobollenti; dopo un tempo stabilito la  $T$  viene alzata a quella pari alla media delle  $T$  di ebollizione delle sostanze più altobollenti e mantenuta per un certo tempo e così via. Il **Programmatore di Temperatura** modifica la  $T$  del forno; esempio:  $T_{\text{iniziale}} = 80^{\circ}\text{C}$  mantenuta per 10 min,  $T$  aumenta di  $40^{\circ}\text{C}/\text{min}$  fino a  $T = 200^{\circ}\text{C}$ , mantenuta per 10 min,  $T$  aumenta fino a  $260^{\circ}\text{C}$ , mantenuta per 10 min,  $T$  aumenta fino a  $270^{\circ}\text{C}$ , mantenuta per 20 min. La separazione delle sostanze avviene poiché queste percorrono la colonna con velocità diverse, in base alla loro diversa affinità per la fase fissa; i soluti usciranno dalla colonna a tempi diversi, dopo la loro introduzione. Il **tempo di ritenzione** è tempo che impiega il soluto ad uscire dalla colonna.

Il rivelatore deve essere molto sensibile e quindi rilevare tracce anche molto piccole di sostanze; inoltre devono essere veloci nel rispondere al passaggio della sostanza, ovvero a rilevarne presenza e quantità. Ne esistono di vari tipi in base alle caratteristiche chimico-fisiche delle sostanze da separare. Per i composti organici alogenati si usa il **rivelatore a cattura di elettroni** (*Electron Capture Detector, ECD*). L'ECD serve per sostanze con elevata affinità per gli elettroni, come i composti alogenati. L'ECD è formato da un'ampolla cui arriva il gas proveniente dalla colonna. L'ampolla contiene due elettrodi: il catodo, per esempio  $^{63}\text{Ni}$  o trizio depositato su titanio e l'anodo, un anello posto tra la parte terminale della colonna e il catodo. L'ECD usa una fonte radioattiva che emette particelle beta in grado di ionizzare un gas (il gas di trasporto); esempio:  $\text{Ar} \rightarrow \text{Ar}^+ + \text{e}^-$ . Gli ioni così generati, per effetto del campo elettrico applicato ai due elettrodi contenuti nel rivelatore, migrano verso questi. Si genera così una corrente elettronica stazionaria tra i due elettrodi che forma la **linea di base**. Quando una molecola organica che contiene gruppi funzionali elettronegativi, come gli alogeni, attraversa il rivelatore, assorbe una parte degli elettroni presenti, per cui il flusso di elettroni diminuisce:  $\text{RCl} + \text{e}^- \rightarrow \text{RCl}^-$ . Questa diminuzione della corrente elettronica viene convertita nel picco che identifica quella molecola. Maggiore è la concentrazione della sostanza che arriva al rivelatore e maggiore è la diminuzione della quantità di cariche e quindi della corrente che passa nel circuito.

L'analisi *qualitativa* di un cromatogramma si effettua mediante l'identificazione dei tempi di ritenzione della sostanza ignota a con quelli di uno standard di riferimento noto. Il tempo di ritenzione si valuta nel punto in cui il picco ha la sua altezza massima.

L'analisi *quantitativa* di un cromatogramma si esegue misurando una dimensione del picco (area, altezza, mV) e rapportando il valore trovato alla quantità di campione analizzato e al volume iniettato (volume finale, VF). Anche in questo caso si fa riferimento ad uno standard. Infatti, l'altezza del picco del campione è proporzionale a quella del picco nel cromatogramma dello standard. Esempio:

1. 50 ng di PCB30 danno un picco di altezza 5 cm;
2. nel cromatogramma del campione ho un picco di 10 cm corrispondente al PCB30 (stesso tempo di ritenzione), quindi la quantità presente nel volume iniettato è 100 ng;
3. questi 100 ng vanno normalizzati rispetto alla quantità di campione che ho preso per le analisi (es. 5 g).

Le concentrazioni finali di ciascuna sostanza per grammo di campione analizzato si calcolano tenendo conto delle perdite che si hanno durante il procedimento analitico di laboratorio, secondo le seguenti equazioni:  $VF/pc \times 1/vi \times 11/10 \times 100/rec \times fcd$ , dove VF è il volume finale a cui è stata portata la frazione del campione da iniettare nel gascromatografo, pc è il peso del campione, vi è il volume iniettato nello strumento (in  $\mu\text{l}$ ), rec è il recupero calcolato e fcd è l'eventuale fattore di concentrazione o diluizione del campione iniettato.