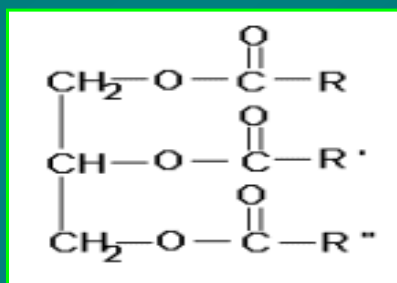


Gas Cromatografia

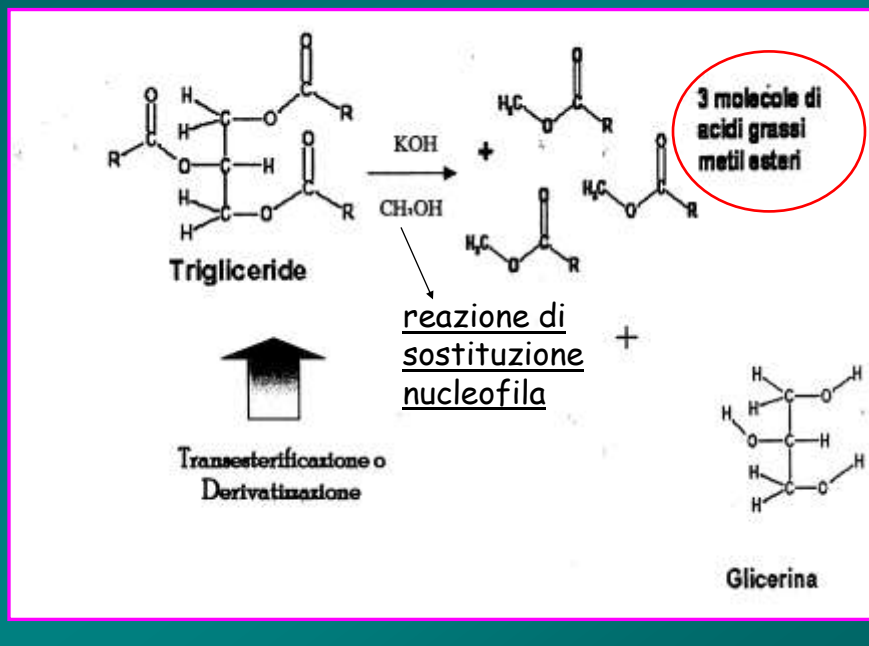
Dott. Raffaele Marrone
raffaele.marrone@unina.it

La frazione lipidica

TRIGLICERIDI



TRANSESTERIFICAZIONE



GAS CROMATOGRAFIA

La tecnica cromatografica consiste nello sfruttare in modo particolarmente efficiente la diversa attitudine che ogni molecola o ione possiede nel distribuirsi tra due differenti fasi (una stazionaria e una mobile).

Tecnica in grado di separare ed analizzare miscele gassose o gassificabili complesse ed in alcuni casi contenenti molecole molto simili tra loro.

Analisi

Quantitative



Qualitative

SEPARAZIONE

Distribuzione dei componenti fra due fasi

Stazionaria (immobile)

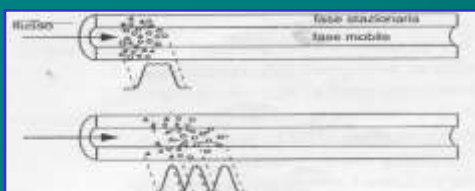
solida, gel, liquida o una miscela solido-liquida

Affinità tra le fasi

Mobile

liquida o gassosa

flussa sopra o all'interno della fase stazionaria



Adsorbimento

La fase stazionaria è un solido sulla cui superficie si trovano dei siti attivi in grado di stabilire legami secondari (dipolo-dipolo, ponte di idrogeno, Van der Waals) con le diverse molecole della miscela da risolvere (separare). Se è un gas, di cromatografia gas-solido (GSC).I

In genere, le molecole che più facilmente vengono fissate sono quelle che presentano gruppi polari, anche se la natura dell'adsorbente influisce sul fenomeno.



I componenti manifestano una certa affinità per la fase stazionaria e vi permangono per un certo tempo

RALLENTAMENTO

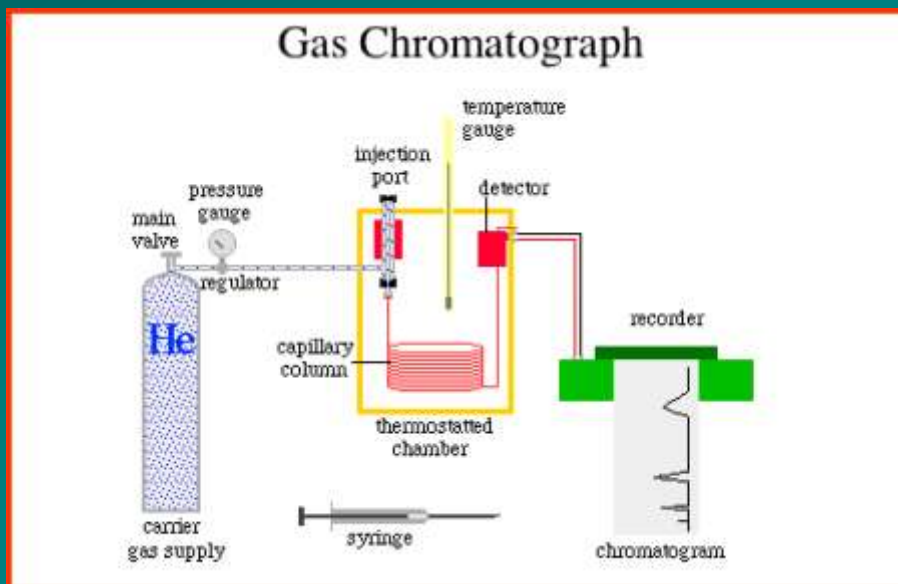
Diversa ritenzione di un componente della miscela rispetto ad altri.

Tempo di Ritenzione

"tempo trascorso dal momento dell'introduzione nella colonna al momento di uscita della stessa"

Tempo in fase fissa + tempo in fase mobile

SISTEMA GAS-CROMATOGRAFICO



INIETTORE

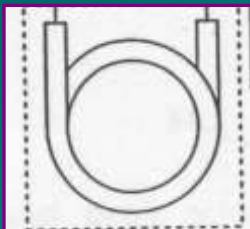


Parte dello strumento dove viene introdotto il campione. Esistono diversi tipi di iniettore che vengono scelti in funzione dello stato dei composti da analizzare. Per i composti in soluzione liquida viene utilizzata l'iniezione con PTV, ossia Vaporizzazione a Temperatura Programmata. Con tale sistema il campione liquido viene vaporizzato istantaneamente e viene veicolato in colonna dal gas di trasporto.

COLONNA

Esistono diverse tipologie di colonne dalle più vecchie IMPACCAATE alla più nuove CAPILLARI. Una colonna capillare consiste in un tubo aperto, avente un diametro interno variabile fra 0,1-0,5 mm, una lunghezza variabile fra 5-100 m, ed un film esterno variabile fra 5-50 μm

FORNO



Parte più grande del GC dove è situata la COLONNA :

permettere di mantenere la temperatura costante (isoterma)

Modificare la temperatura con precisione e rapidamente in relazione alla programmata



RIVELATORE FID

Si tratta di un rivelatore universale ma distruttivo in quanto i campioni vengono bruciati per ottenerne la trasformazione in ioni allo stato gassoso. Il carrier viene convogliato verso un ugello a cui giungono anche idrogeno

ed aria, necessari per alimentare una piccola fiammella. Una resistenza posta accanto all'ugello provoca l'accensione della fiammella. Quest'ultima si trova circondata da un collettore cilindrico caricato positivamente; il secondo elettrodo del circuito, quello caricato negativamente, è costituito dall'ugello stesso.

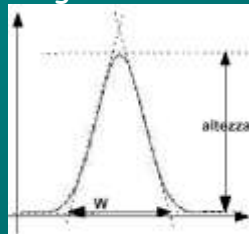
La microfiamma provoca una debolissima corrente ionica tra gli elettrodi, che vengono mantenuti sotto una differenza di potenziale di circa 300V. Questa corrente, elaborata, amplificata e misurata, viene inviata ad un opportuno registratore e costituisce il rumore di fondo. Quando un componente della miscela raggiunge la fiamma, viene subito ionizzato con conseguente aumento dell'intensità di corrente e quindi rivelato con un segnale più intenso. La sensibilità del rivelatore è molto elevata, infatti si può arrivare ai nanogrammi.

CROMATOGRAMMI

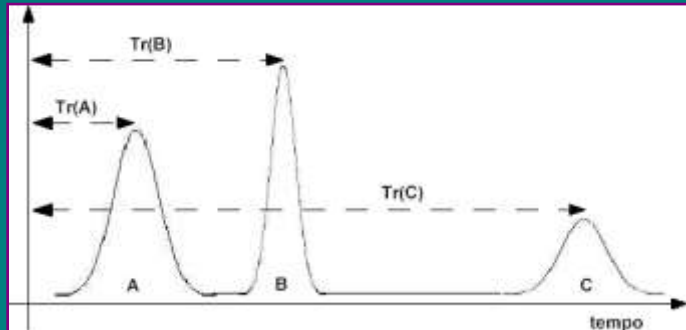
Ogni sostanza in uscita dalla colonna genera un segnale che verrà registrato sotto forma di 'picco'.

- **Altezza del picco.** È la distanza fra il massimo del picco e la sua base, misurata perpendicolarmente all'asse dei tempi.

- **Ampiezza del picco.** È il segmento delimitato sulla base del picco dai punti di intersezione delle tangenti tracciate nei punti di flesso di ambedue i lati.



La successione dei vari picchi, corrispondenti alle varie sostanze in uscita dalla colonna, costituisce il 'cromatogramma'. Il cromatogramma si presenta come in figura, dove in ordinate é riportata la risposta del rivelatore e in ascisse i tempi di uscita delle varie sostanze.



tempo di ritenzione

- è il tempo impiegato tra l'iniezione del campione e la registrazione del massimo del picco;
- dipende dalla natura della sostanza, dalla colonna e dalle condizioni operative;
- è fondamentale per le analisi qualitative.

area del picco

- è la superficie delimitata dal contorno del picco e la linea di base;
- dipende dalla quantità di sostanza in uscita e dalle caratteristiche del rivelatore;
- è fondamentale per le analisi quantitative.

ANALISI QUALITATIVA

un confronto dei tempi di ritenzione tra la miscela in esame e sostanze pure o miscele di composizione nota.

ANALISI QUANTITATIVA

un confronto dei tempi di ritenzione tra la miscela in esame e sostanze pure o miscele di composizione nota.

- normalizzazione interna;
- taratura diretta;
- standardizzazione esterna;
- standardizzazione interna;
- metodo dell'aggiunta.

Normalizzazione interna

L'area (S) di ogni picco va corretta introducendo dei fattori di correzione (f) in modo da renderle confrontabili l'una con l'altra e cioè proporzionali alla concentrazione (C) dei rispettivi composti.

Taratura diretta

Con questo metodo é possibile determinare la concentrazione dei soli componenti che interessano.

- Si inietta un volume noto del campione e si registra il cromatogramma
- Si inietta lo stesso volume di una miscela a concentrazione nota ('standard') dei componenti da determinare, e si registra il cromatogramma.

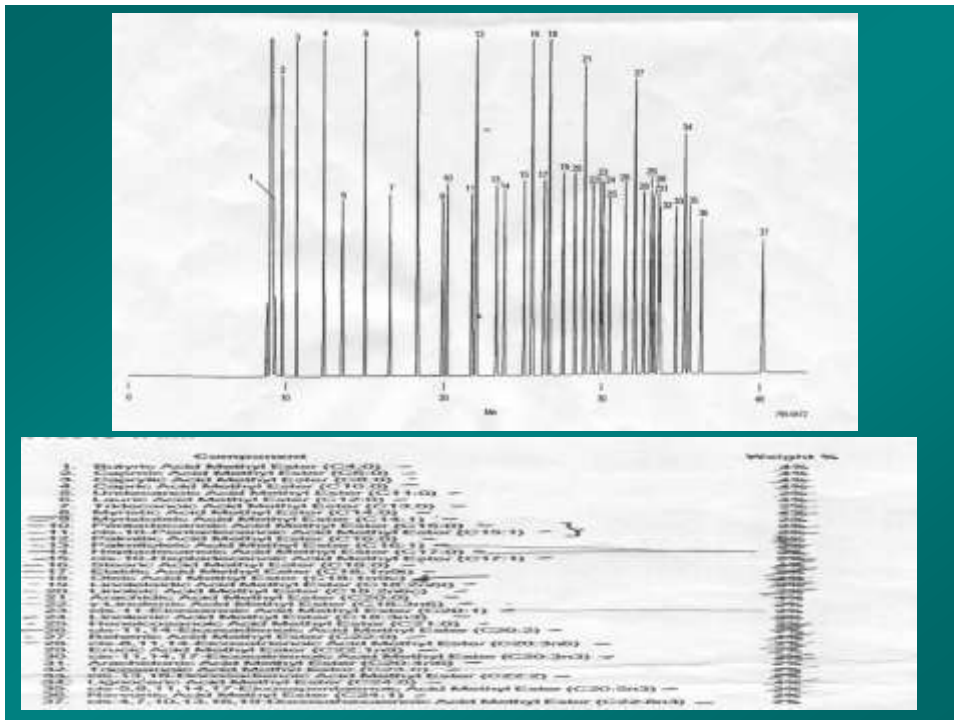
Si procede al calcolo diretto; ad esempio per una sostanza A:

$$S_{A\text{standard}} : C_{A\text{standard}} = S_{A\text{campione}} : C_{A\text{campione}}$$

Standardizzazione esterna

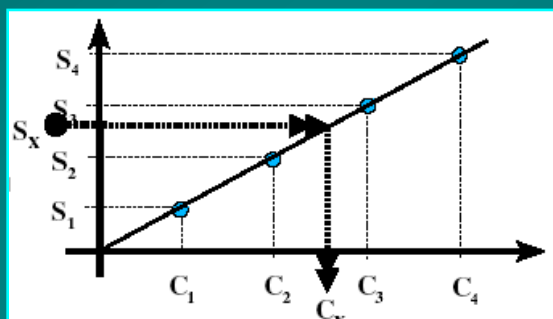
E' basato sullo stesso principio del metodo precedente, con la differenza che si procede alla costruzione di una curva di taratura:

- Si preparano soluzioni standard a concentrazione nota del componente da determinare.
- Si iniettano quantitativi rigorosamente uguali di ogni soluzione standard e si riportano su un grafico le aree dei picchi ottenuti in funzione della concentrazione dello standard corrispondente.



• Si inietta poi un'aliquota del campione rigorosamente uguale a quelle precedenti, si misura l'area del componente che interessa e, attraverso il grafico, si risale alla sua concentrazione.

Anche questo metodo presenta il *problema dell'accuratezza* delle quantità iniettate.



Standardizzazione interna

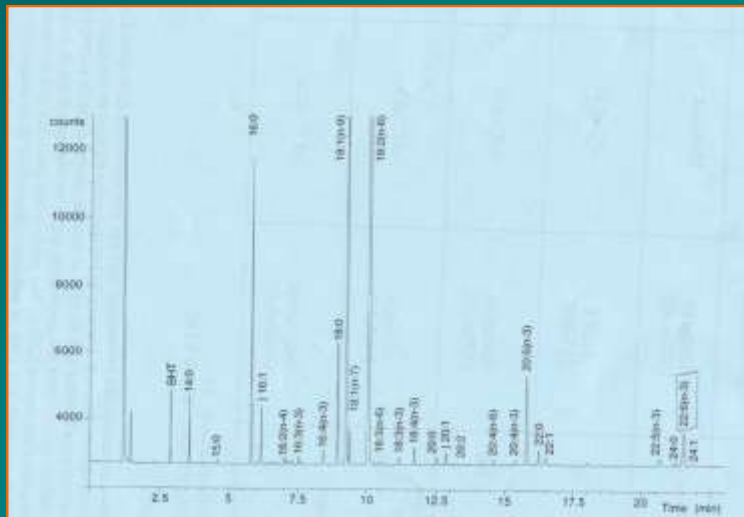
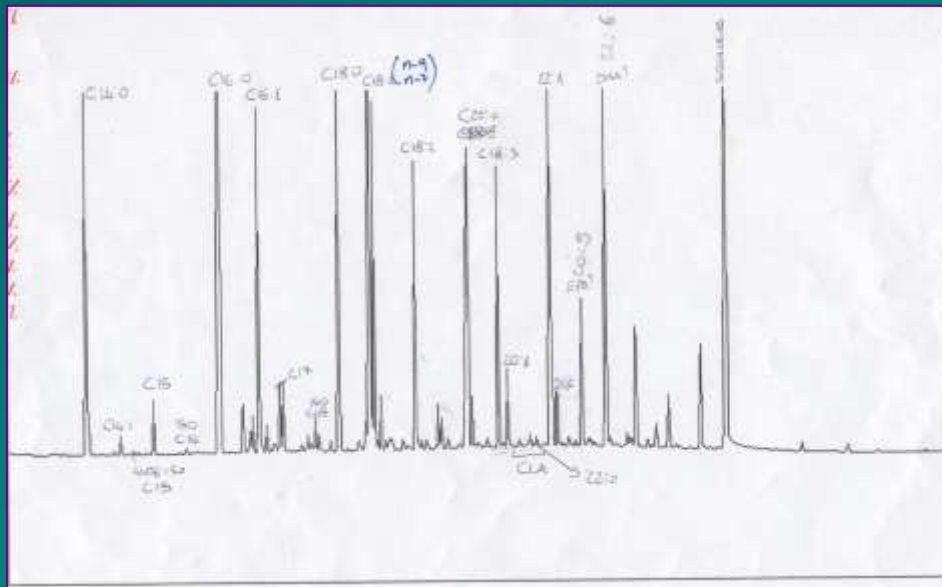
È un metodo che consente di ottenere risultati molto accurati, in quanto sfrutta il rapporto tra l'area del picco dell'analita e l'area del picco di una sostanza ("standard interno") appositamente aggiunto in quantità nota.

Si prepara una soluzione standard utilizzando due composti, dei quali uno deve essere il componente che interessa presente nella miscela da analizzare, l'altro è invece un composto, detto standard interno.

requisiti:

- non essere presente nella miscela da analizzare;
- essere ben risolto dagli altri componenti;
- avere un tempo di ritenzione simile a quello della sostanza da determinare;
- non contenere impurezze rivelabili;
- non reagire con nessun componente della miscela.

Cromatogramma di orata allevamento



Olio di semi