

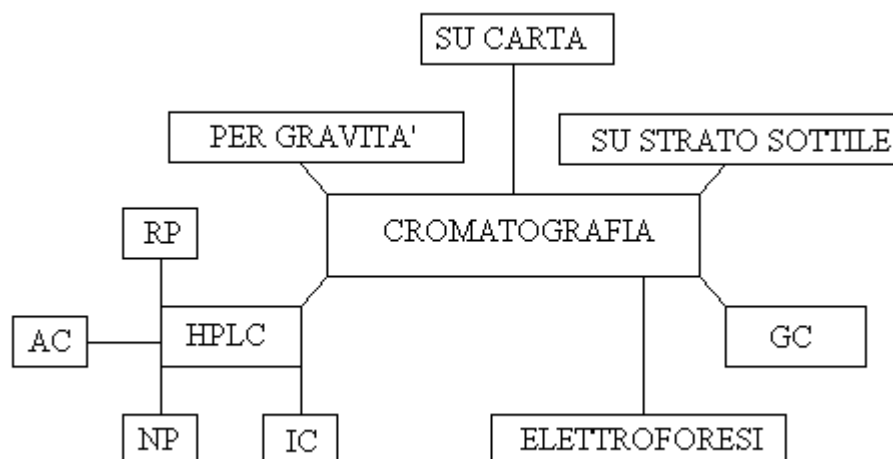
CROMATOGRAFIA

1- Generalità

La cromatografia può essere definita come la tecnica che permette la separazione di molecole e/o ioni sulla base della loro differente capacità di essere trasportati in un opportuno apparato. Questa differente capacità di muoversi è data dalla affinità delle molecole o ioni analiti per due fasi immiscibili, una fase di trasporto mobile ed una fase stazionaria. In generale le tecniche cromatografiche si classificano sulla base delle fasi coinvolte. La fase mobile può essere un gas (GC), un liquido (LC) o un fluido supercritico (SFC). La fase stazionaria può essere un liquido o un solido per cui si potrà avere la GLC, LLC, SFLC, GSC, LSC a SFSC. Questi diversi tipi di cromatografia possono prevedere che la fase stazionaria sia carta, gel di silice depositato su vetro o impaccato su colonna, di polimeri sintetici come tali o derivatizzati con varie funzioni polari, apolari o ioniche ancora una volta impaccati su colonna come ancora altri materiali come diatomee ecc.. La fase mobile può scorrere sulla stazionaria per gravità, per suzione per effetto elettroendoesmotico, per pompaggio per mezzo di bombole (GC) o di vere e proprie pompe (HPLC) che possono produrre pressioni anche molto elevate (300 atm).

Nell'ambito della cromatografia liquida ed in particolare dell'HPLC trovano posto la cromatografia in fase normale (NP), in fase inversa (RP), ionica (IC) a di affinità (AC), mentre nella GC si possono effettuare su colonne impaccate o capillari .

Schematicamente:



Classificazione dei metodi cromatografici.

Classificazione	Metodi specifici	Fasi stazionarie	Tipo di equilibrio
Cromatografia in fase liquida (LC) (Fase mobile: liquida)	Ripartizione Liq.-Liq. O Liq.-fase legata Liq.-Solido Scambio ionico Esclusione dimensionale	Liquido adsorbito su solido Specie legata ad una superficie solida Resina a scambio ionico Solido polimerico poroso	Ripartizione tra liquidi immiscibili Ripartizione tra liquido e superficie legata Adsorbimento Scambio ionico Ripartizione effetto di esclusione dimensionale
Gas-cromatografia (Fase mobile Gas)	Gas-Liq. Gas-fase legata Gas-Solido	Liquido adsorbito su solido Specie legata ad una superficie solida Solido	Ripartizione tra gas e liquido Ripartizione tra liquido e fase legata Adsorbimento
Cromatografia supercritica (SFC) (Fase mobile, fluido supercritico)		Specie organica legata ad una superficie solida	Ripartizione tra fluido supercritico a fase legata

La prima applicazione risale alla fine nell'ottocento quando Tswett (botanico russo) ha separato i pigmenti colorati presenti nelle piante con una colonna riempita con CaSO_4 come fase stazionaria e con etere di petrolio come fase mobile.

La gas-cromatografia ha avuto origine negli anni '40- '50 quando è stata formulata la "teoria dei piatti". La gas-cromatografia capillare ha avuto origine negli anni '60 quando è stata formulata la teoria delle velocità. L'HPLC ha avuto origine negli anni '70 e l'HPIC a metà degli anni '70 sebbene gli studi e le sintesi sulle resine a scambio ionico risalgano a molti anni prima.

Le separazioni cromatografiche hanno luogo a causa di una "migrazione differenziale" delle specie presenti in soluzione. Questo effetto può essere descritto con delle velocità differenziali lungo la colonna cromatografica dovute alla interazione delle molecole di soluto con la fase stazionaria.

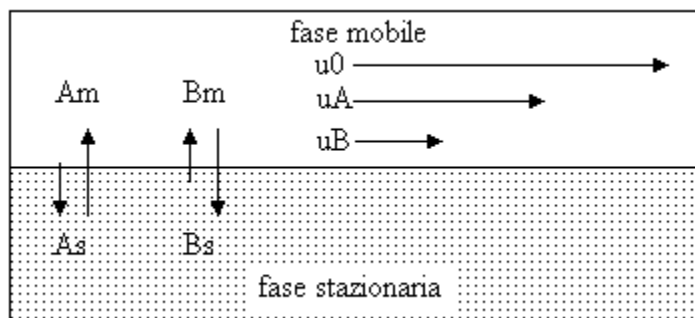


FIG. 1

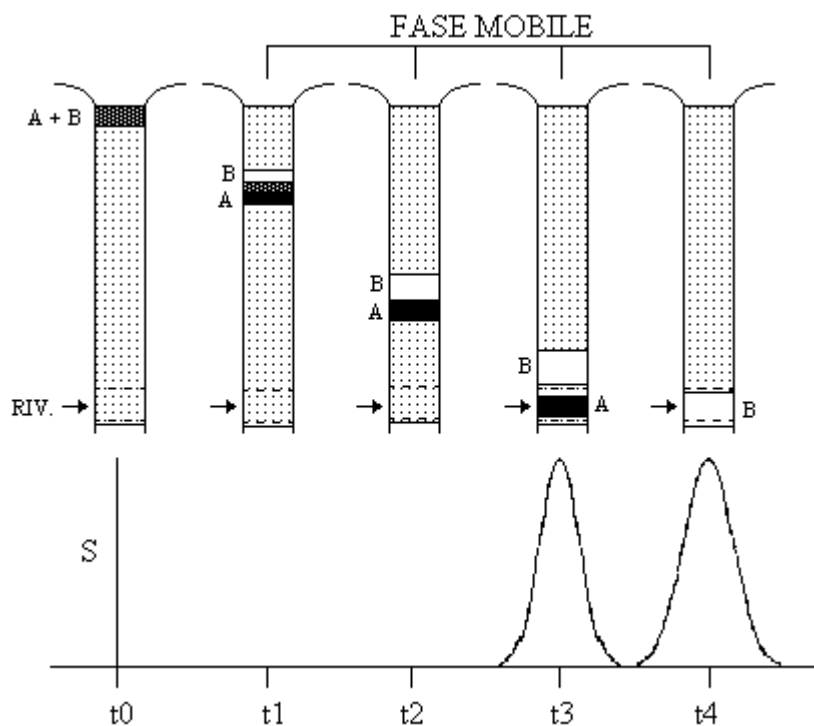


FIG. 2

In generale il processo di ritenzione è dovuto al seguente equilibrio:

$$A_m = A_s$$

caratterizzato dalla seguente costante:

$$K_A = \frac{C_{A,s}}{C_{A,m}} = \frac{n_{A,s}}{V_s} \frac{V_m}{n_{A,m}} = \frac{n_{A,s}}{n_{A,m}} \frac{V_m}{V_s} = k'_A \Phi \quad 1$$

$$k'_A = K_A \frac{V_s}{V_m} = \frac{n_{A,s}}{n_{A,m}} \quad \text{fattore di capacità} \quad 2$$

$$\Phi = \frac{V_m}{V_s} \quad \text{rapporto di fase} \quad 3$$

Il movimento differenziale può essere descritto dal rapporto delle velocità di movimento all'interno di una colonna di lunghezza L di una generica specie analita, A, e di una specie che non subisce nessun ritardo da parte della fase stazionaria e cioè di una specie non trattenuta. Questo rapporto è equivalente alla frazione molare della specie analita nella fase mobile che è la porzione di analita che è effettivamente in movimento.

$$\frac{u_A}{u_0} = \frac{n_{A,m}}{n_{A,m} + n_{A,s}} \quad 4$$

La velocità di migrazione della fase mobile e del soluto all'interno del sistema sono quindi date da:

$$u_0 = \frac{L}{t_0}; \quad u_A = \frac{L}{t_A} \quad 5$$

$$u_A = u_0 \frac{1}{1+k'_A} \quad 6$$

$$t_A = t_0(1+k'_A) \quad 7$$

da cui si può ricavare una formulazione operativa di k' cioè ottenibile da misure sperimentali di tempi di ritenzione

$$k'_A = \frac{t_A - t_0}{t_0} \quad 8$$

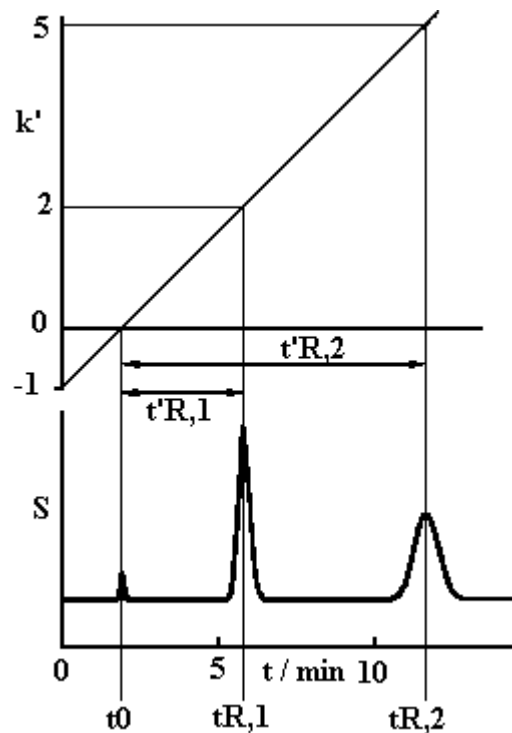


FIG. 2'

Il tempo di ritenzione è determinato dalla lunghezza della colonna. Tale dipendenza si può ricavare da

$$t_A = t_0(1+k'_A) = \frac{L}{u_0}(1+k'_A) = \frac{HN}{u_0}(1+k'_A) \quad 9$$

da cui si vede che t_A è proporzionale ad H/u_0 con H altezza teorica del piatto equivalente ed N numero di piatti teorici presenti nella colonna relativi all'analita A .

$t_R = N H/u_0 (1+k')$; diagramma t_R vs. u_0 con $N=1000$, $H=0.001$; $k'=5$

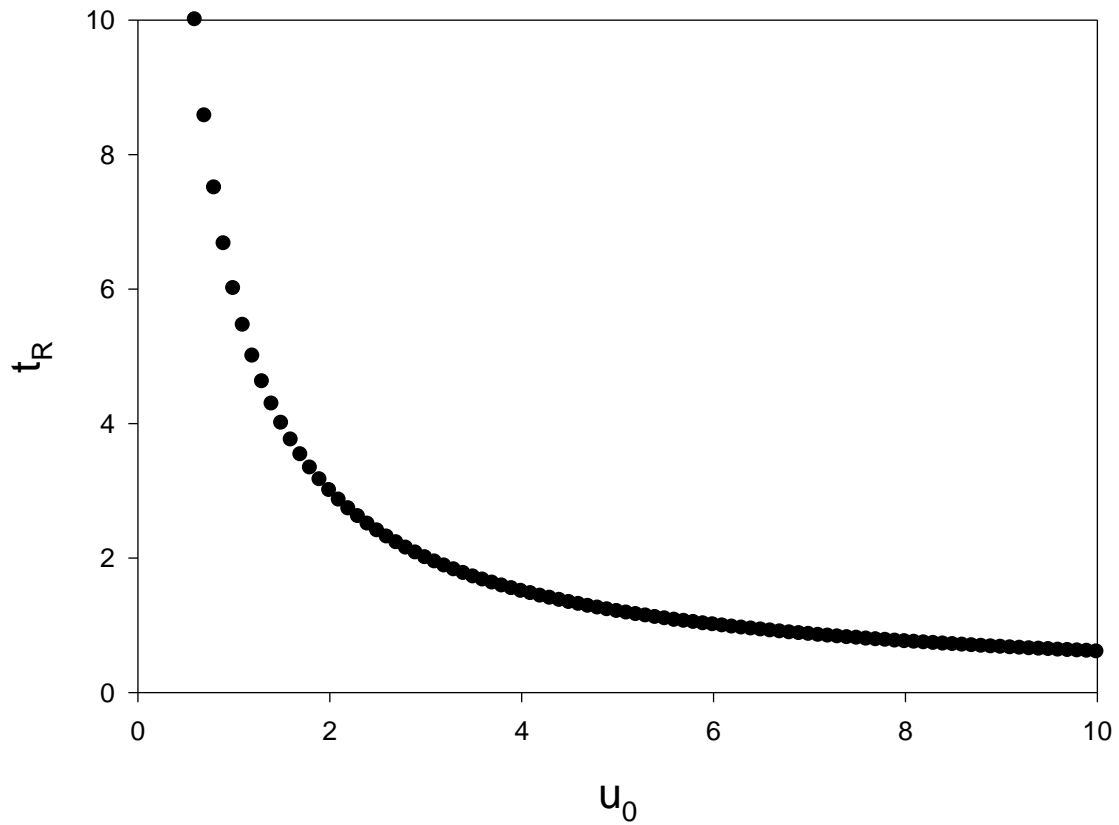


FIG. 3: t_A vs. H/u_0

Se la forma del picco è gaussiana (cosa che in generale non è allora $f(t)=h \exp(-0.5[(t-t_A)/\sigma A]^2)$ con $h=A/(\sigma \sqrt{2\pi})$).

Gaussiana con $\sigma=1$ e $\mu=t_R=5$

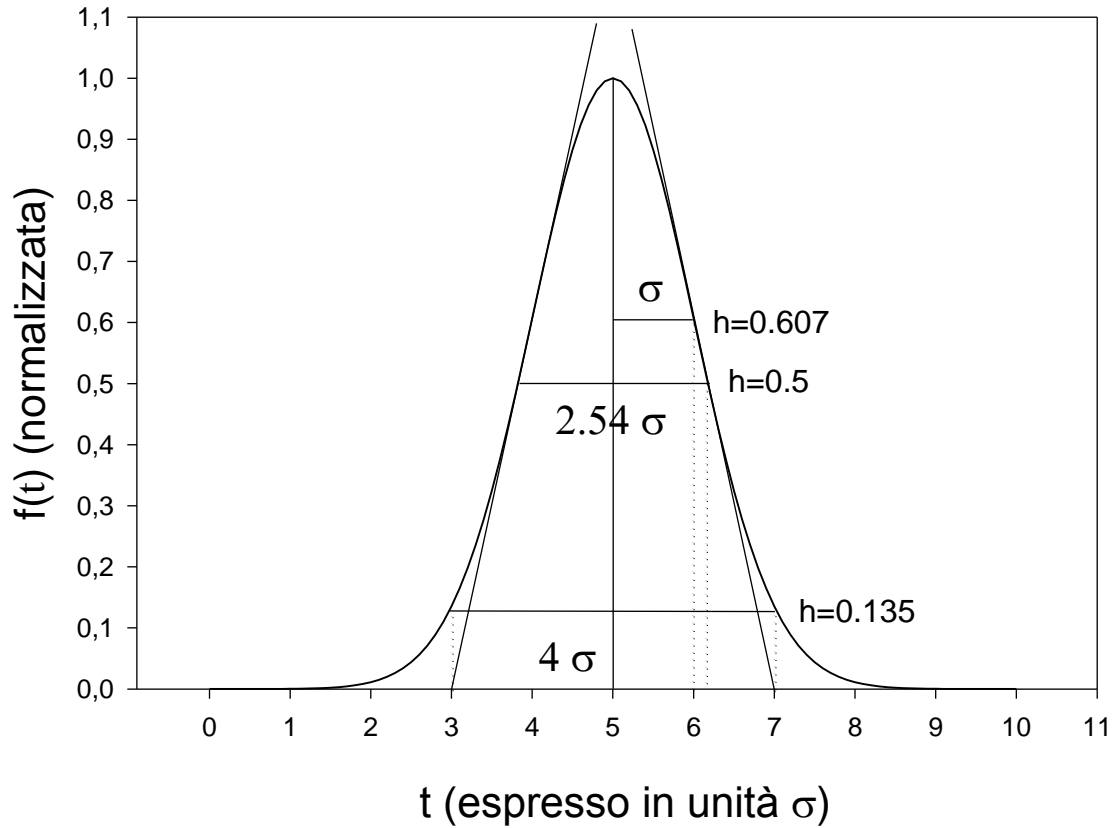


FIG. 4

La circostanza di avere più picchi nello stesso cromatogramma porta a definire.

$$k'_A = K_A \frac{V_s}{V_m} \quad k'_B = K_B \frac{V_s}{V_m} \quad 10$$

$$\frac{k'_B}{k'_A} = \frac{t_B - t_0}{t_A - t_0} = \alpha \quad \text{fattore di selettività} \quad 11$$

La forma allargata o meno della gaussiana è determinata dalla sua deviazione standard che si può mettere in relazione con il numero di piatti teorici della colonna che definisce l'efficienza. Questo parametro è definito come

$$N = \left(\frac{t_r}{\sigma} \right)^2 \quad 12$$

Poiché l'ampiezza a metà altezza di una gaussiana è 2.54σ e alla base è 4σ si ottiene anche

$$N = 5.54 \left(\frac{t_r}{w_{0.5}} \right)^2 \quad 13$$

$$N = 16 \left(\frac{t_r}{w} \right)^2 \quad 14$$

TEORIA DEI PIATTI

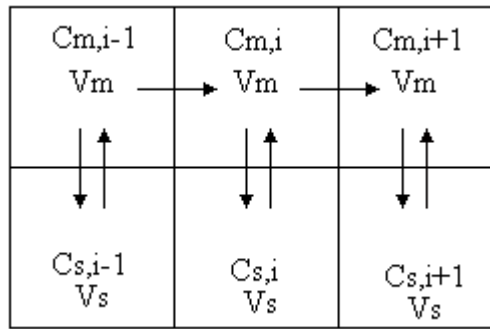


FIG.5

Lo spostamento di un elemento di volume di eluente, dv , dal piatto $i-1$ a quello i e da i a $i+1$ comporta, per il piatto i , la seguente situazione

$$dn_i = (C_{m,i-1} - C_{m,i})dV \quad 15$$

ed essendo

$$n_i = C_{s,i}V_s + C_{m,i}V_m \quad 17$$

$$K = \frac{C_{s,i}}{C_{m,i}} \quad 18$$

si ottiene

$$dn_i = V_m dC_{m,i} + V_s dC_{s,i} \quad 19$$

$$dn_i = V_m dC_{m,i} + V_s K dC_{m,i} \quad 20$$

$$dn_i = (V_m + KV_s) dC_{m,i} \quad 21$$

Uguagliando la 15 e la 21 si ottiene

$$(C_{m,i-1} - C_{m,i})dV = (V_m + KV_s) dC_{m,i} \quad 21$$

$$\frac{dC_{m,i}}{dV} = \frac{C_{m,i-1} - C_{m,i}}{V_m + KV_s} \quad 22$$

Il termine a denominatore, $V_m + KV_s$, rappresenta il volume equivalente del piatto teorico e con esso si adimensionalizza il volume portando a

$$dv = \frac{dV}{V_m + KV_s} \quad 23$$

$$\frac{dC_{m,i}}{dv} = C_{m,i-1} - C_{m,i} \quad 24$$

Soluzione di questa equazione differenziale è la distribuzione di Poisson

$$C_{m,N} = \frac{C_{m,0} v^N}{N!} e^{-v} \quad 25$$

In questa equazione N è l'ultimo piatto e $C_{m,0}$ è la concentrazione iniziale, prima del passaggio in colonna cromatografica. Quest'ultima può essere espressa con:

$$C_{m,0}V_m - C_{s,0}V_s = n_{tot} \quad 26$$

$$K = \frac{C_{s,0}}{C_{m,0}} \quad 27$$

$$C_{m,0}(V_m - KV_s) = n_{tot} \quad 28$$

$$C_{m,N} = \frac{n_{tot}}{V_m + KV_s} \frac{v^N}{N!} e^{-v} \quad 29$$

$$n_{m,N} = n_{tot} \frac{v^N}{N!} e^{-v} \quad 30$$

$$F_{N,v} = \frac{n_{m,N}}{n_{tot}} = \frac{v^N}{N!} e^{-v} \quad 31$$

Dato che

$$N! \cong N^N e^{-N} \sqrt{2\pi N} \quad 32$$

si ottiene

$$F_{N,v} = \frac{1}{\sqrt{2\pi N}} \left(\frac{v}{N} \right)^N e^{N-v} \quad 33$$

Questa equazione rappresenta il profilo sull'ultimo piatto N(uscita dalla colonna) al variare di v.

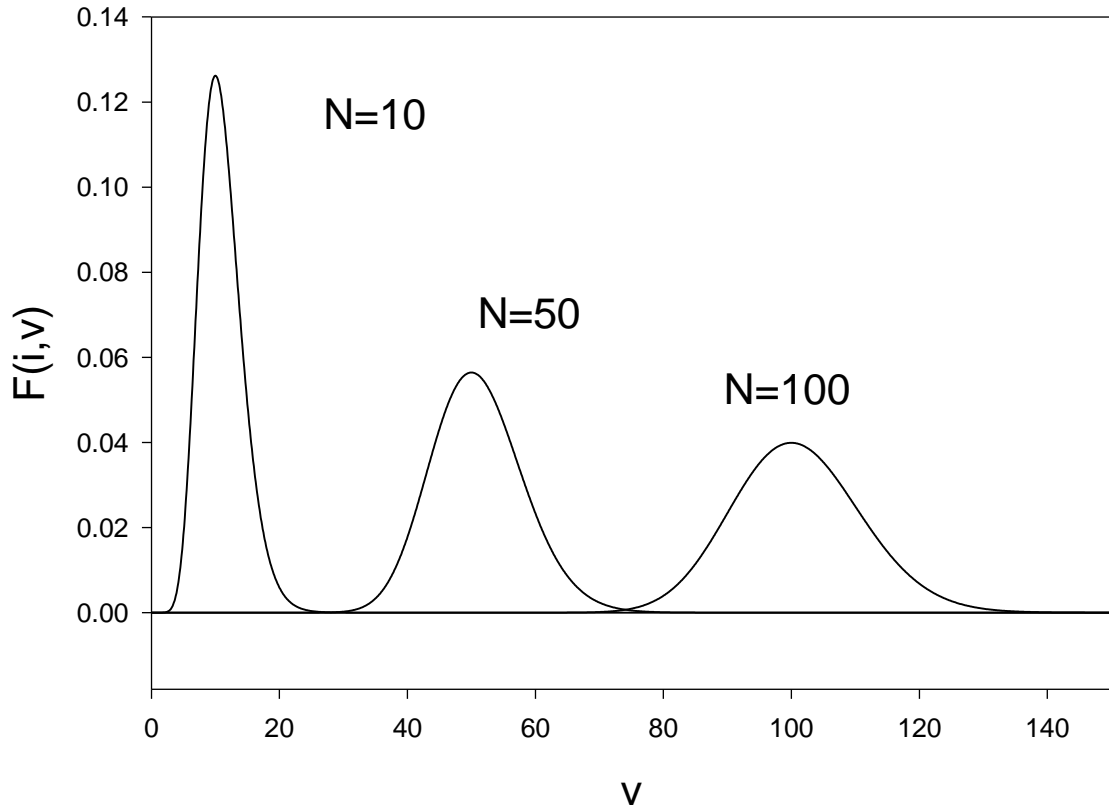


FIG. 6

Per il generico piatto i si ha quindi

$$F_{i,v} = \frac{1}{\sqrt{2\pi i}} \left(\frac{v}{i}\right)^i e^{i-v} \quad 34$$

Questa funzione, che tende alla Gauss per N (ovvero i) elevato, fornisce

1 le frazioni in i al variare di v

2 le frazioni intorno al piatto i

3 il vertice della curva di distribuzione dipende da \sqrt{i} . Al progredire della distribuzione coinvolgendo nuovi piatti il picco si allarga e si abbassa.

Per la caratterizzazione della curva si calcola il valore del massimo dall'azzeramento della derivata prima mentre le coordinate dei flessi, che danno l'idea dell'allargamento dei picchi, vengono ricavate dall'annullamento della derivata seconda. Dalla derivata prima si ricava quindi il volume di ritenzione, V_R .

$$\frac{dC_{m,i}}{dv} = \frac{d}{dv} \frac{C_{m,0} v^N}{N!} e^{-v} = 0 \quad 35$$

$$\frac{C_{m,0}}{N!} (N v^{N-1} e^{-v} - v^N e^{-v}) = 0 \quad 36$$

$$\frac{C_{m,0}}{N!} e^{-v} v^{N-1} (N - v) = 0 \quad 37$$

quest'ultima equazione si annulla per $N = v$ pertanto

$$N = v_R = \frac{V_R}{V_m + KV_s} \quad 38$$

$$V_R = N(V_m + KV_s) \quad 39$$

L'annullamento della derivata seconda individua l'allargamento della distribuzione

$$\frac{d}{dv} \left[\frac{C_{m,0}}{N!} e^{-v} v^{N-1} (N-v) \right] = 0 \quad 40$$

$$\frac{C_{m,0}}{N!} \left[-e^{-v} v^{N-1} (N-v) + (N-1) e^{-v} v^{N-2} (N-v) - e^{-v} v^{N-1} \right] = 0 \quad 41$$

$$\frac{C_{m,0}}{N!} e^{-v} v^{N-2} [-v(N-v) + (N-1)(N-v) - v] = 0 \quad 42$$

$$\frac{C_{m,0}}{N!} e^{-v} v^{N-2} [-vN + v^2 + N^2 - Nv - N + v - v] = 0 \quad 43$$

$$\frac{C_{m,0}}{N!} e^{-v} v^{N-2} [v^2 + N^2 - 2vN - N] = 0 \quad 44$$

Questa equazione si annulla per

$$v^2 - 2vN + N^2 - N = 0 \quad 45$$

$$v_{flesso} = \frac{N \pm \sqrt{N^2 - N^2 + N}}{1} \quad 46$$

$$v_{flesso} = N \pm \sqrt{N} \quad 47$$

Da quest'ultima equazione si deriva che se N è grande la Poisson è la distribuzione di Gauss e

$$v_{flesso} = N \pm \sigma \quad 48$$

$$\sigma = \sqrt{N} = \sqrt{v_R} \quad 49$$

Da questa equazione è possibile determinare l'efficienza della colonna che è definita come il numero di piatti teorici equivalenti, N , sulla base di parametri sperimentali. Nella distribuzione di Gauss l'ampiezza, W , è data da 2σ pertanto si può scrivere

$$\frac{N}{2\sqrt{N}} = \frac{v_R}{2\sqrt{v_R}} = \frac{V_R}{W} \quad 50$$

$$\frac{N^2}{4N} = \frac{v_R^2}{4v_R} = \left(\frac{V_R}{W}\right)^2 \quad 51$$

$$\frac{N}{4} = \frac{v_R}{4} = \left(\frac{V_R}{W}\right)^2 \quad 52$$

$$N = 4\left(\frac{V_R}{W}\right)^2 = 4\left(\frac{t_R}{W_t}\right)^2 = \left(\frac{t_R}{\sigma}\right)^2 \quad 53$$

Gaussiane con $\sigma_1=1$ e $\mu_1=t_{R1}=4$ e $\sigma_2=1.2$ e $\mu_2=t_{R2}=11$

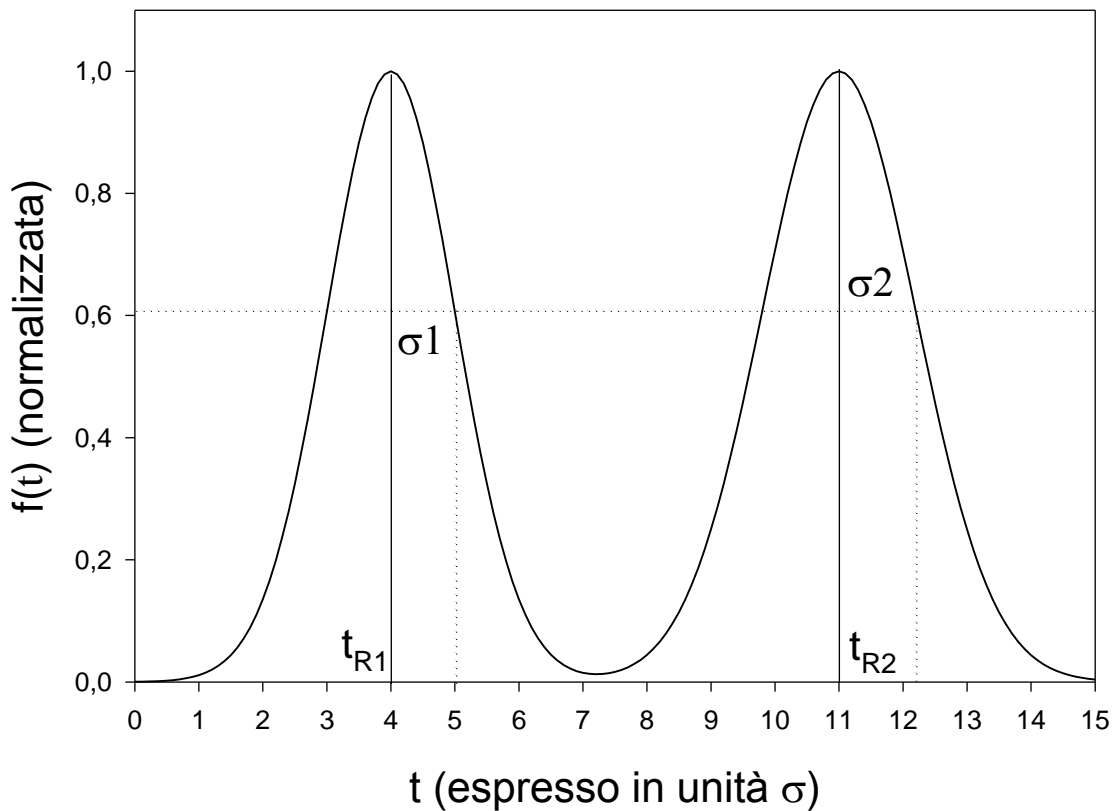


FIG. 7

Dai risultati appena ottenuti sembrerebbe che fossimo arrivati ad una contraddizione:

$$F_{N, V_R} = \frac{1}{\sqrt{2\pi N}} \quad 54$$

all'aumentare di N l'intensità del picco si abbassa e

$$N = \left(\frac{t_R}{\sigma}\right)^2 \quad 55$$

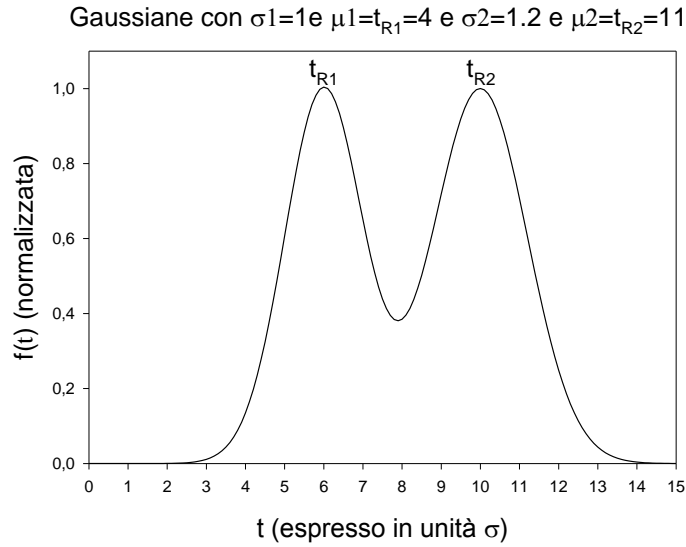
all'aumentare di N il picco si stringe. In realtà nel primo caso si descrive il progredire dell'eluato su nuovi piatti di volume equivalente costante $V_m + KV_s$ (la colonna continua ad allungarsi) mentre nel

secondo caso si considera una colonna finita con un numero di piatti costante di volume totale $(V_m)_{tot} + K(V_s)_{tot}$ una volta suddivisa in N1 piatti, una seconda in N2 piatti, ecc..

RISOLUZIONE

FIG. 8

Siano dati due picchi gaussiani eluiti con tempi di ritenzione simili e cioè siano parzialmente sovrapposti. Dalle definizioni dei 3 parametri fondamentali k' , N ed α definiamo come risoluzione



$$R = \frac{t_B - t_A}{(W_B + W_A)/2} \quad 56$$

$$R = \frac{t_B - t_A}{(4\sigma_B + 4\sigma_A)/2} \quad 57$$

$$R = \frac{t_B - t_A}{2(\sigma_B + 4\sigma_A)} \quad 58$$

$$R \approx \frac{\sqrt{N}}{2} \frac{t_B - t_A}{t_B + t_A} \quad 59$$

$$R = \frac{\sqrt{N}}{2} \frac{t_0(1+k'_B) - t_0(1+k'_A)}{t_0(1+k'_B) + t_0(1+k'_A)} \quad 60$$

$$R = \frac{\sqrt{N}}{2} \frac{k'_B - k'_A}{k'_B + k'_A + 2} \quad 61$$

$$R = \frac{\sqrt{N}}{2} \frac{k'_B - k'_A}{k'_B + k'_A} \frac{k'_B + k'_A}{k'_B + k'_A + 2} \quad 62$$

$$R = \frac{\sqrt{N}}{2} \frac{\alpha - 1}{\alpha + 1} \frac{\bar{k}'}{\bar{k}' + 1}$$

63

Questa equazione è costituita da tre termini di cui il primo descrive l'influenza dell'efficienza sulla risoluzione, il secondo la selettività ed il terzo il coefficiente di capacità medio.

Con i parametri riportati in Fig.8 si ottiene

$$R = \frac{t_B - t_A}{2(\sigma_B + 4\sigma_A)} = \frac{11 - 4}{2(1 + 1.2)} = \frac{7}{4.4} = 1.59$$

Dall'equazione 63 è possibile dunque pensare di ottimizzare la separazione tra due picchi. Le possibilità sono però più limitate di quello che si può prevedere. Infatti, osservando i tre diagrammi di fig. 9, che esprimono la risoluzione sulla base dei tre parametri trovati precedentemente, si vede infatti che per raddoppiare la risoluzione agendo sull'efficienza è necessario quadruplicare la lunghezza della colonna (fig.9(a)) dato che $N=L/H$. Questa operazione è improponibile dato il grande aumento della pressione in colonna nel caso dell'HPLC e l'aumento dei tempi di ritenzione in generale.

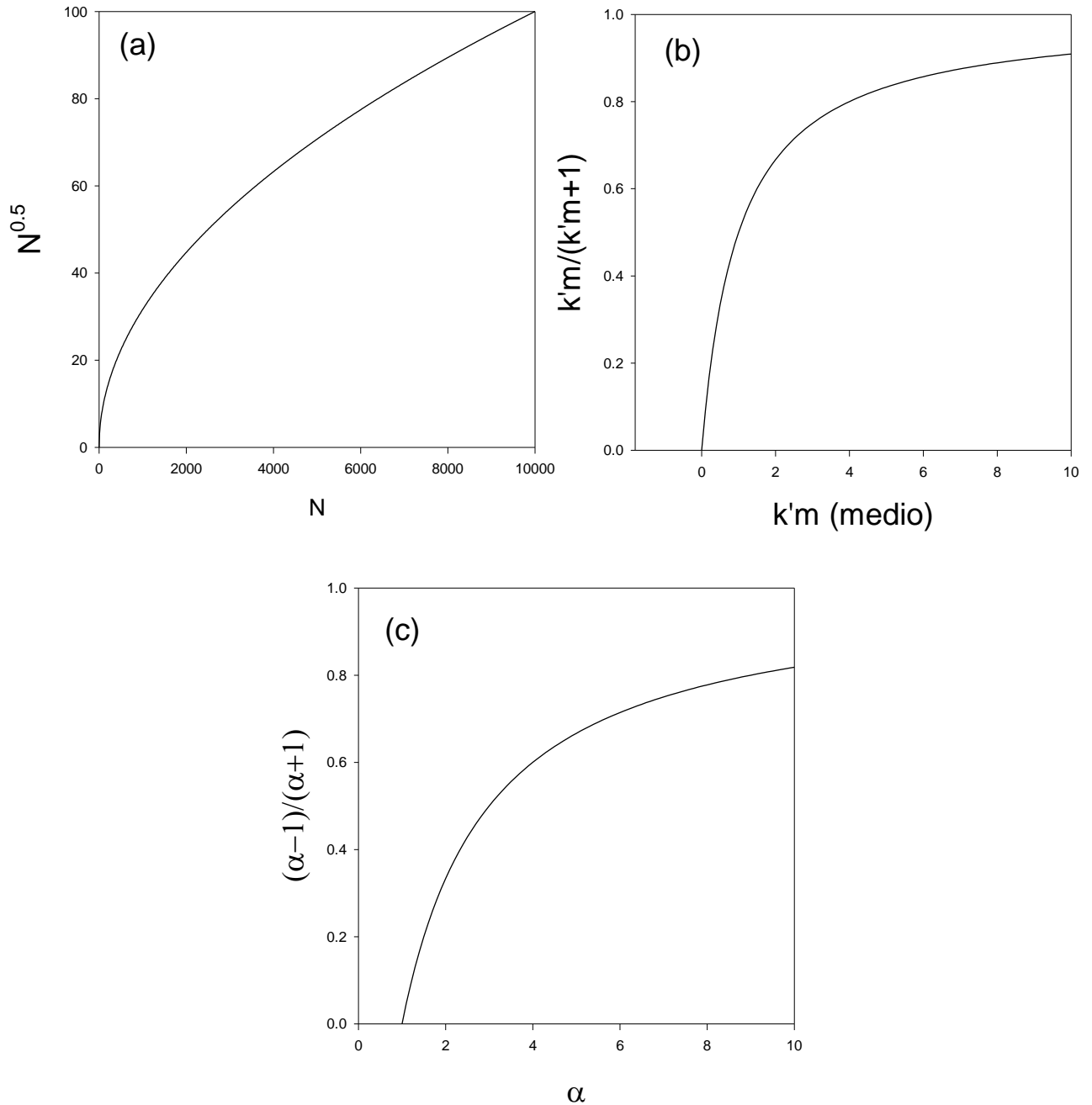


FIG. 9

L'aumento della risoluzione provocato dall'aumento della costante di capacità media $k'm$ è molto ridotto (FIG.9(b)) poiché all'aumentare di questo parametro il rapporto $k'm/(k'm+1)$ tende ad 1 e quindi gioca sempre meno sulla ritenzione. I valori ottimali per $k'm$ sono compresi tra 3 e 5 per colonne impaccate. E' da notare inoltre che $k'm$ è un parametro termodinamico che dipende molto quindi dalla composizione della fase mobile.

Il terzo termine appare come il più promettente ma anche in questo caso si ha solo un lento aumento di R all'aumentare di α (FIG.9(c)). Infatti per $\alpha=1$ allora $(\alpha-1)/(\alpha+1)=0$ cioè nessuna risoluzione; per $\alpha=2$ allora $(\alpha-1)/(\alpha+1)=1/3$. Dal punto di vista termodinamico questo significa un grande aumento di selettività in quanto $k'_2=2 k'_1$. Portare questo parametro da 0 a 0.33 è quindi estremamente importante. α dipende molto dalla fase stazionaria, poi da quella mobile ed in terzo luogo dalla temperatura.

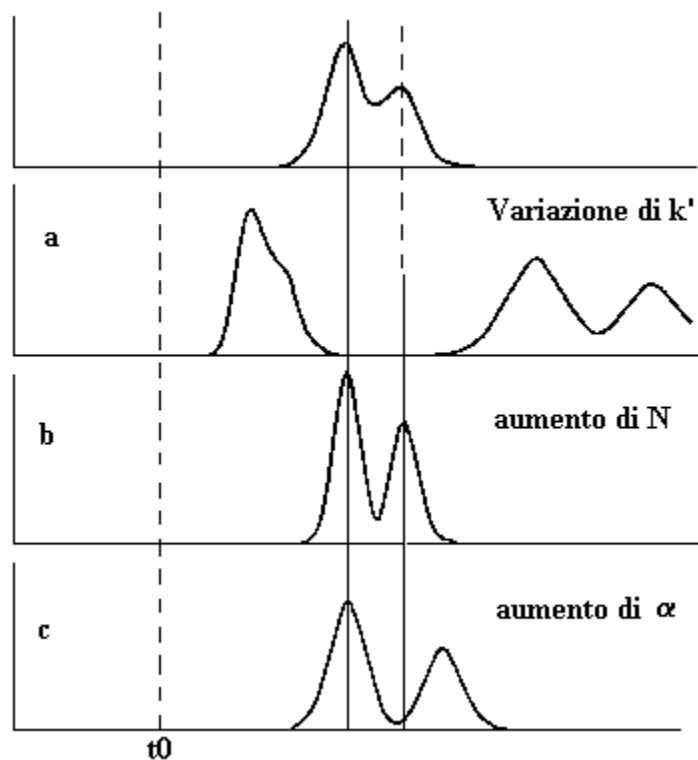


FIG. 10

A questo proposito si può notare che:

$$\frac{d \ln K}{dT} = -\frac{\Delta H}{RT^2} \quad 64$$

con ΔH = entalpia di soluzione in fase stazionaria. Se V_s/V_m è indipendente dalla temperatura allora

$$\frac{d \ln k'}{dT} = -\frac{\Delta H}{RT^2} \quad 65$$

da cui

$$k' = e^{-\frac{\Delta H}{RT}} \quad 66$$

In LC il ΔH è piccolo la T gioca poco, mentre è diverso in GC dove la temperatura è il fattore determinante. In generale un cromatogramma ha più picchi. La forma dei picchi può essere approssimata ad una gaussiana su cui si possono individuare le grandezze di importanza qualitativa come è stato visto sopra. In realtà il segnale di un picco è raramente gaussiano per cui ci sono altri parametri che caratterizzano la forma dei picchi. Uno di questi è il fattore di scodatura definito da $T=b/a$ misurati al 10% dell'altezza del picco. La scodatura è in genere dovuta a deviazioni dalla linearità delle isoterme di adsorbimento. E' possibile avere anche un effetto fronting dovuto in generale a sovraccarico della colonna o a mancanza di siti di ritenzione.

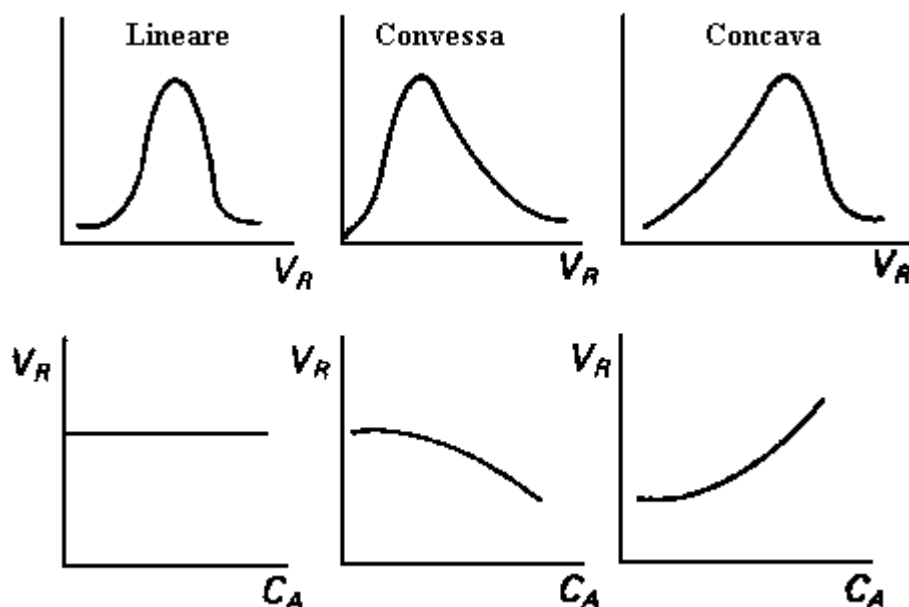


FIG. 11

Da tutto ciò che abbiamo visto finora la cromatografia può essere vista come una scatola nera in cui entra il campione, subisce alcune modificazioni e poi esce per la rivelazione. La risoluzione R è un parametro che consente di valutare il grado di separazione di due analiti (picchi) ma devono essere evidenziate alcune limitazioni nel suo uso che talvolta possono essere molto pesanti:

R è indipendente dall'altezza dei picchi, cioè è valida solo nel campo di linearità della risposta e se la larghezza del picco rimane costante all'aumentare della quantità iniettata.

R è valida per picchi di forma gaussiana ma di solito essi non lo sono.

R non può essere facilmente ricavata dall'equazione riportata in quanto è necessario conoscere la larghezza ed i tempi di ritenzione di entrambi i picchi esaminati.

Inoltre si è visto che N è fissato dalla scelta della colonna che non può essere variata di molto in dimensioni; k' è espressione di effetti termodinamici ma influisce poco sulla separazione; α sembrerebbe il modo migliore per ottimizzare la risoluzione ma soffre anch'esso di alcune limitazioni poiché riguarda solo due componenti e non dice nulla sui tempi di analisi. Nei casi reali può essere necessario ottimizzare un intero cromatogramma ed è per questo necessario inquadrare correttamente il problema, conoscere quanto più possibile della soluzione da analizzare e provvedere ad una restrizione delle tante possibilità di scelta delle tecniche cromatografiche che si sono.

TEORIA CINETICA

La teoria vista finora è stata sviluppata ammettendo che il soluto si trovi inizialmente tutto sul piatto 0 (il primo). L'occupazione di più piatti iniziali provoca un allargamento della banda nata dal processo di eluizione.

Il processo cromatografico è un processo dinamico che approssima la situazione di equilibrio ma mai la raggiunge. Le cause che impediscono il raggiungimento dell'equilibrio sono varie. La valutazione dei loro effetti sul profilo dell'eluato costituisce la teoria delle velocità. Abbiamo già visto che $H = L/N$ è l'altezza equivalente del piatto teorico. H grande (0.1 mm) corrisponde ad una colonna poco efficiente mentre H piccolo (0.01 mm) corrisponde ad una colonna efficiente. Le dimensioni di H dipendono, oltre che dalla dispersione propria della eluizione anche da altri fattori che contribuiscono alla varianza totale. Dato che la varianza ha proprietà additiva,

$$S_{\text{tot}}^2 = S_1^2 + S_2^2 + \dots + S_n^2$$

la varianza della banda dell'eluato è pensata come somma di diversi contributi che nel caso di una colonna impaccata sono:

1 Processo a cammini multipli (contributo della diffusione vorticososa)

$$\sigma_1^2 = \gamma d_p$$

con γ costante dipendente dall'impaccamento (è compreso tra 1 e 2) e d_p il diametro delle particelle di impaccamento.

2 Diffusione longitudinale in fase mobile

$$\sigma_2^2 = \lambda \frac{D_m}{u}$$

con λ costante dipendente dall'impaccamento (fattore di ostruzione o di tortuosità che è compreso tra 0.6 e 0.8 per colonne impaccate), D_m coefficiente di diffusione dell'analita in fase mobile ed u velocità lineare media dell'eluente.

3 Trasferimento di massa in fase mobile ed in fase mobile stagnante

$$\sigma_3^2 = f_m(k') \frac{d_p^2}{D_m} u$$

con $f_m(k')$ una funzione del fattore di capacità, d_p , D_m ed u con lo stesso significato di prima.

4 Trasferimento di massa in fase stazionaria

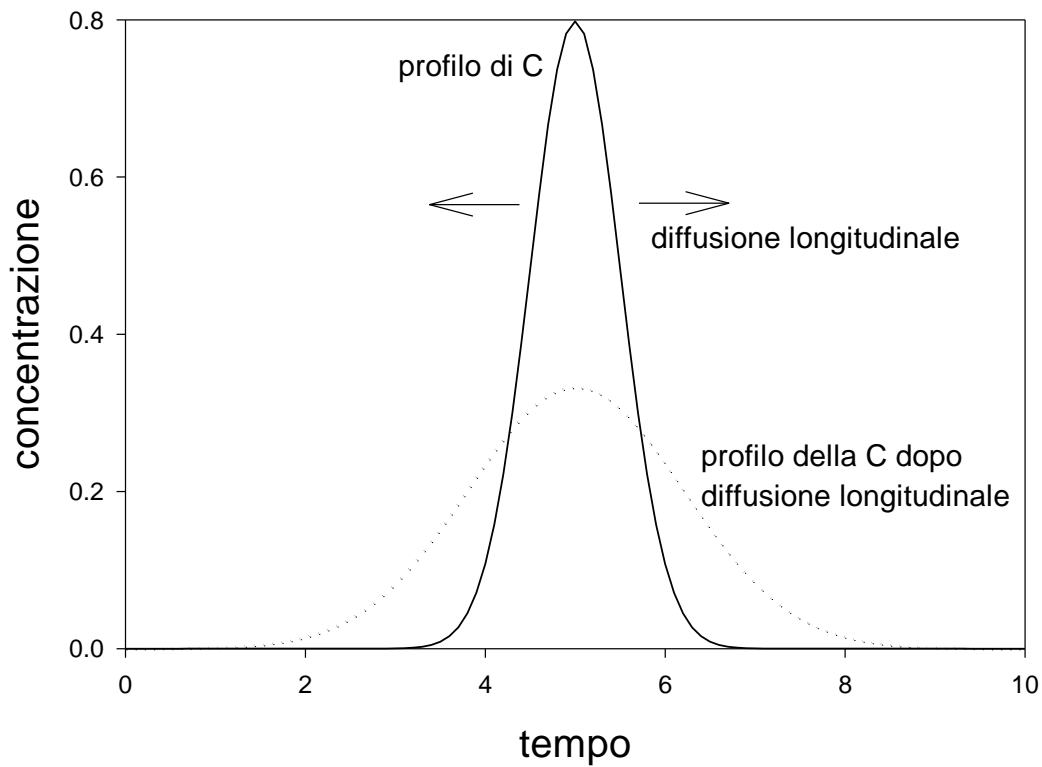
$$\sigma_4^2 = f_s(k') \frac{d_f^2}{D_s} u$$

con d_f spessore del film di fase stazionaria e D_s coefficiente di diffusione dell'analita in fase stazionaria.

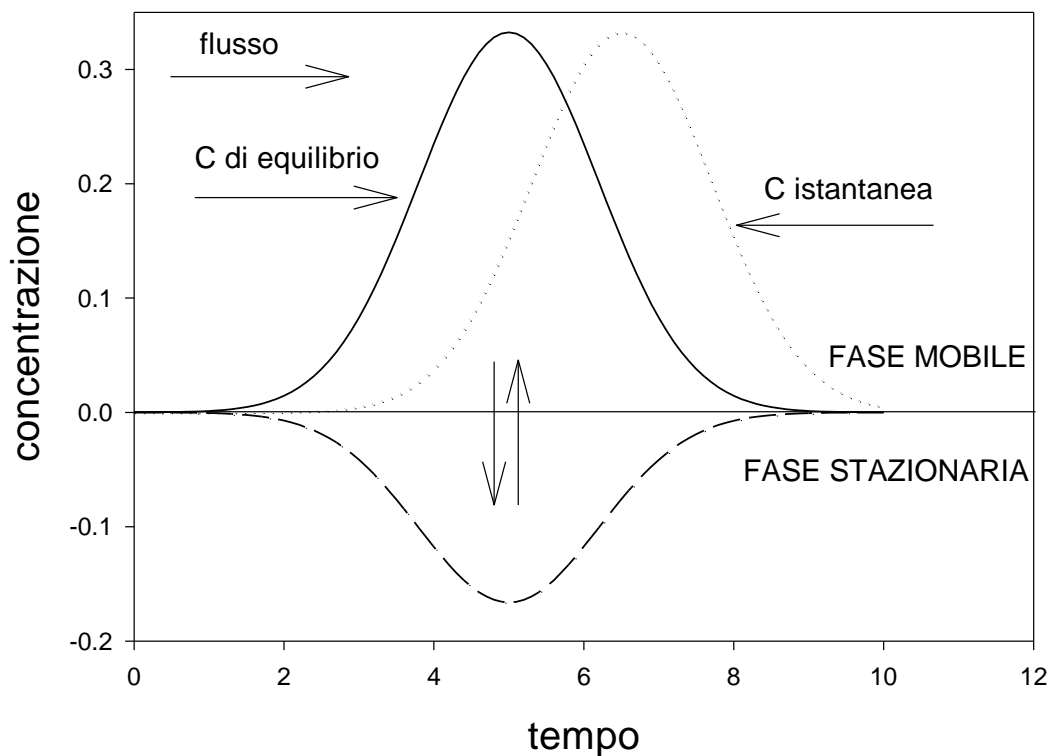
In definitiva, l'altezza del piatto teorico è espressa dalla equazione di van Deemter che per la GC è

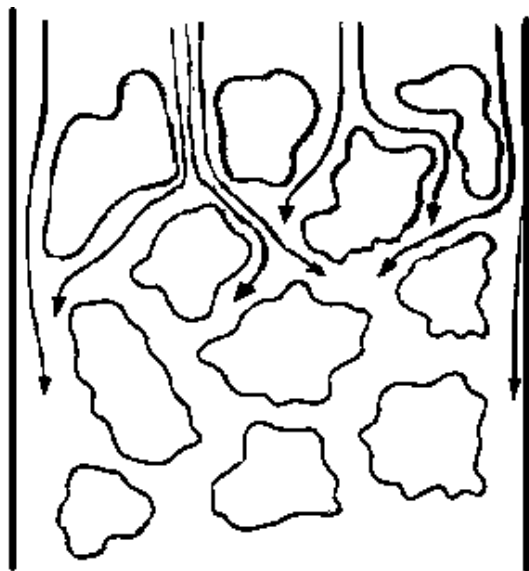
$$H = \sigma_1^2 + \sigma_2^2 + \sigma_3^2 + \sigma_4^2 = \gamma d_p + \lambda \frac{D_m}{u} f_m(k') \frac{d_p^2}{D_m} u + f_s(k') \frac{d_f^2}{D_s} u$$

Contributo della diff. longitudinale all'allargamento della banda

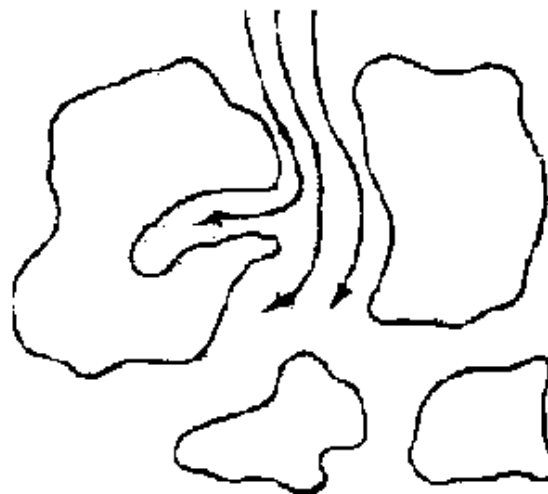


Contributo della diff. tra le fasi all'allargamento della banda

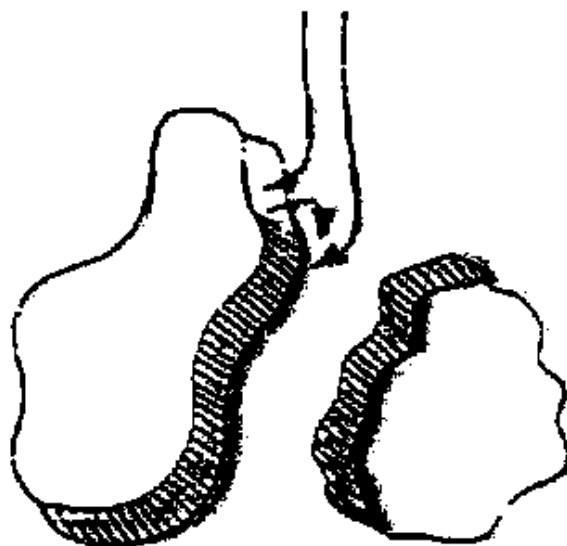




percorsi multipli



trasferimenti di massa in fase stagnante



trasferimenti di massa tra le fasi

In definitiva per la GC:

$$HETP = A + B/u + (CS + CM) u$$

Per la HPLC

$$HETP = A/(1+E/u) + B/u + (CS + CM) u$$

E' da ricordare che l'andamento dell'HETP è diverso tra la GC e l'HPLC in quanto sono diversi i parametri che lo determinano:

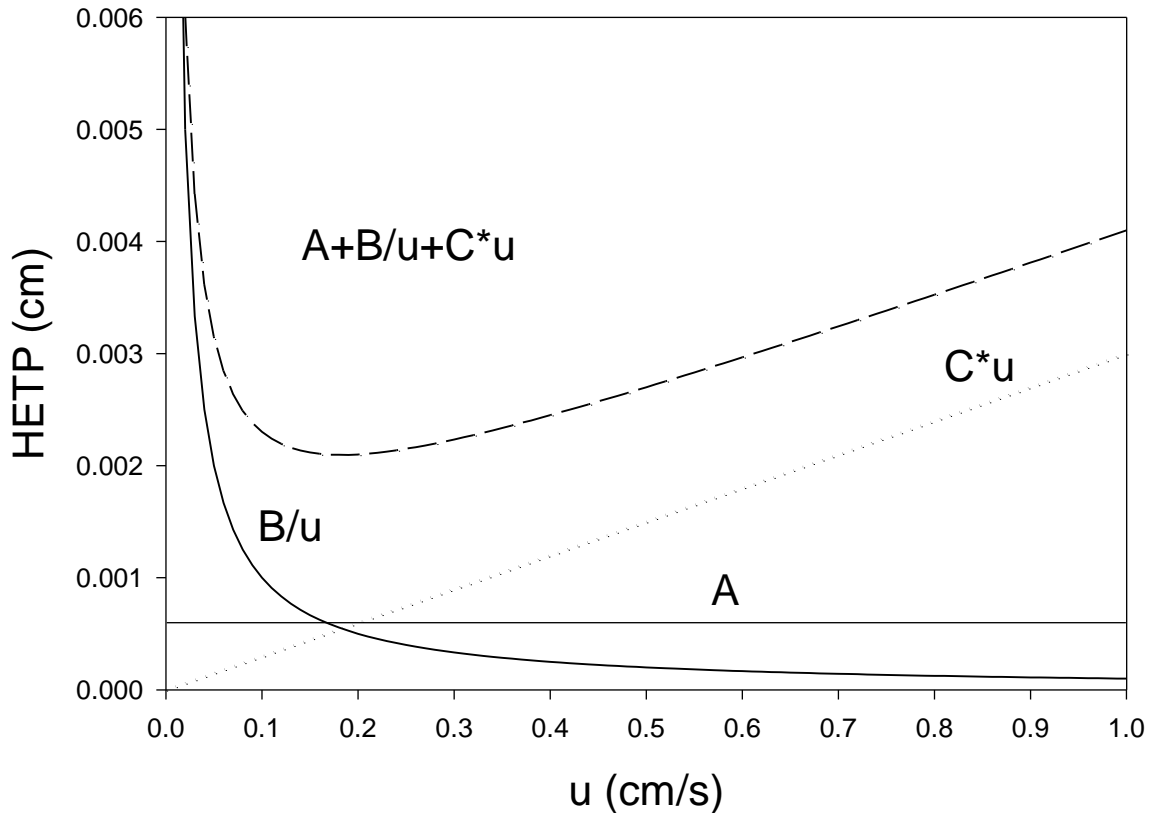
	GAS	LIQUIDI	SFC
D (cm ² s ⁻¹)	10 ⁻¹	10 ⁻⁵	10 ⁻³ 10 ⁻⁴
Densità (g cm ⁻³)	10 ⁻³	1	0.2-0.9
viscosità (poise)	10 ⁻⁴	10 ⁻²	10 ⁻² -10 ⁻¹
n° di Reinold	10	100	

L'andamento dell'equazione di van Deemter è mostrato in FIG. 12

Per colonne capillari di raggio r si ottiene

$$H = 2 \frac{D_m}{u} + f_m(k') \frac{r^2}{D_m} u + f_s(k') \frac{d_f^2}{D_s} u$$

rappresentazione della equazione di Van Deemter:
 A=0.001; B=0.0001; C=0.003



Ulteriori contributi alla varianza sono dovuti allo strumento ed in particolare, all'iniettore, alle connessioni, al rivelatore sia come volume di cella che come velocità di risposta.

L'analisi qualitativa si effettua sulla base dei tempi di ritenzione che sono direttamente legati alla costante di ripartizione tramite il k' . E' comunque necessaria la disponibilità dell'analita standard con cui effettuare un confronto.

L'analisi quantitativa si realizza confrontando le aree dei picchi o le altezze. A questo proposito è necessario disporre di rivelatori adatti che possono essere di due tipi: rivelatori di massa e di concentrazione

Rivelatori di massa

$$y(t) = k \frac{dm}{dt}$$

$$y(t)dt = kdm$$

$$\int_{t_1}^{t_2} y(t) dt = k \int_{t_1}^{t_2} dm$$

$$A = k m$$

Rivelatori di concentrazione

$$y(t) = k \frac{dc(t)}{dt}$$

$$y(t) dt = k \frac{dm}{dV} = k \frac{dm}{F dt}$$

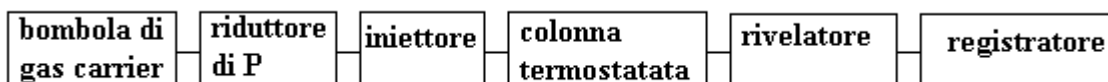
$$\int_{t_1}^{t_2} y(t) dt = \frac{k}{F} \int_{t_1}^{t_2} dm$$

$$A = k \frac{m}{F}$$

Le procedure per l'analisi quantitativa sono basate su metodi di calibrazione: metodi di calibrazione esterna, metodo delle aggiunte tarate e dello standard interno.

GASCROMATOGRAFIA

In questo tipo di cromatografia le fasi stazionarie sono solide o liquide mentre la fase mobile è un gas. La fase solida impaccata sopravvive solo per la GC dei gas permanenti. La ritenzione è dovuta solamente alla interazione tra soluto e fase stazionaria. Non c'è quindi interazione tra soluto e fase mobile che si riduce solamente a fase di trasporto. Lo schema a blocchi di un gascromatografo è dato nella figura seguente:



I gas usualmente impiegati sono H₂, N₂, He, e la loro scelta è condizionata dal rivelatore. La pressione del gas di trasporto realizza di solito flussi dell'ordine di decine di ml/min per le colonne impaccate e di 1 ml/min o meno per le capillari. Il sistema di iniezione è a siringa, a valvola, on-column, split o splitless. Le colonne impaccate hanno un diametro dell'ordine dei mm mentre le capillari delle centinaia di micron.

COLONNE	Capillari	Impaccate (3 mm)	Impaccate (6 mm)
Diametro interno	0.25-0.5 mm		
Piatti per metro	3000 (H=0.3 mm)	2500	1000
Lunghezza massima	150 m	20	20
Piatti teorici	450,000	50,000	20,000
% fase liquida		5	10
Spessore fase liq.	1 µm	5	10
Granul. supp. (mesh)	25	80	50
Flusso medio	1 ml/min	20	70
Velocità lineare	25 cm/s	10	7
V. max di campione	0.01 µL	2	20

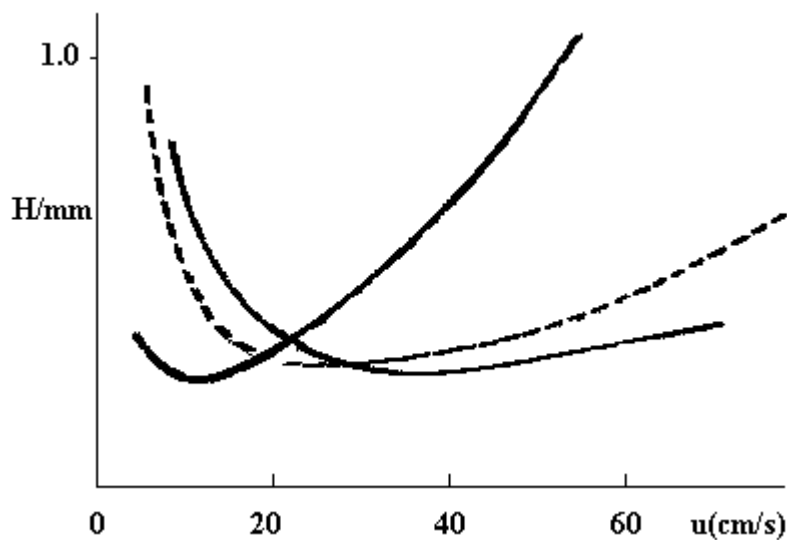


FIG. XX. Effetto della densità della fase mobile H

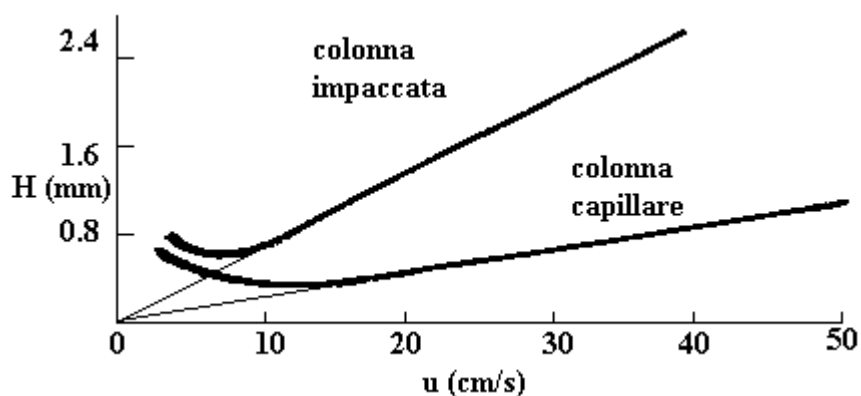


FIG. XX. Confronto tra di colonne impaccate e capillari.

SCelta DELLA COLONNA

Data l'altissima efficienza delle colonne capillari, la scelta tra colonne impaccate e capillari di fatto non esiste più a favore di queste ultime. Le colonne impaccate continuano ad essere utilizzate solo per alcune applicazioni tra cui l'analisi di gas permanenti e di alcune miscele di alcoli.

I fattori da considerare nella scelta della colonna capillare sono basati sulla natura del campione che induce la scelta su:

_ tipo di fase stazionaria:

Il principio operativo è quello che "il simile scioglie il simile, pertanto per molecole apolari si sceglieranno colonne con fasi stazionarie apolari per molecole polarizzabili colonne con fasi stazionarie mediamente polari e per molecole polari colonne con fasi stazionarie polari.

Le fasi stazionarie possono essere legate o non legate. Le prime sono molto più stabili termicamente poiché presentano un “bleeding” inferiore (il bleeding o sanguinamento, è la perdita di fase stazionaria causata dal flusso di gas e dall’alta temperatura).

_ spessore del film della colonna capillare

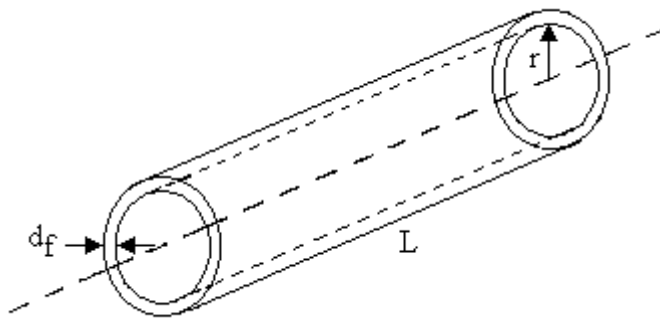
Per quanto riguarda lo spessore del film, al suo aumentare diminuisce l’efficienza, aumentano i tempi di ritenzione (ovvero la temperatura necessaria per eluire un dato analita può essere superiore).

_ diametro interno della colonna capillare

Il diametro interno è correlato allo spessore del film nel rapporto di fase:

$$\frac{V_m}{V_s} = \beta = \frac{r}{2d_f}$$

Questo rapporto misura il potere di ritenzione e di carico di una colonna fissata la sua natura. β grande significa poca ritenzione.



$$V_m = \pi r^2 L$$

$$V_s = 2\pi r d_f L$$

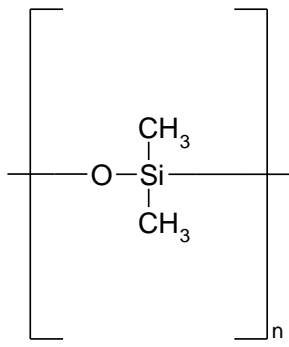
$$\frac{V_m}{V_s} = \frac{\pi r^2 L}{2\pi r d_f L} = \frac{r}{2d_f}$$

_ lunghezza della colonna.

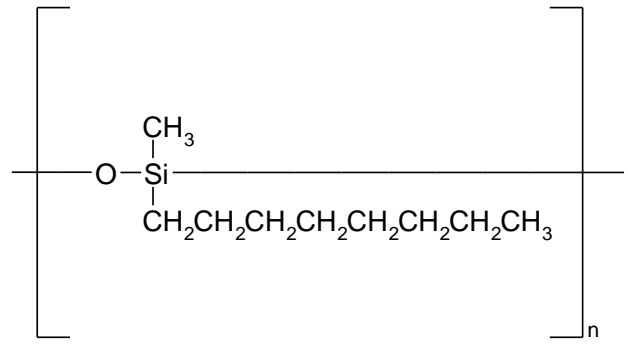
Come già sappiamo una maggiore lunghezza della colonna comporta una maggiore risoluzione anche se la colonna risulta più delicata in termini di fragilità (possono essere presenti problemi di caduta di pressione)

MANCA INDICE DI KOVATS.

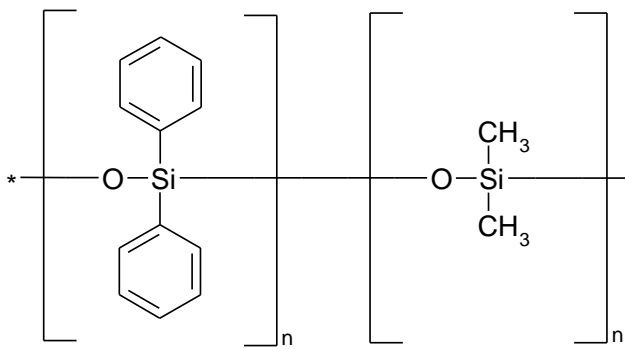
Le fasi stazionarie disponibili sono molte e le seguenti sono solo quelle rappresentative delle tre categorie menzionate prima: apolari, mediamente polari e polari.



Polidimetilsilossano



poli(50% n-ottil/50% metilsilossano)



n=5%

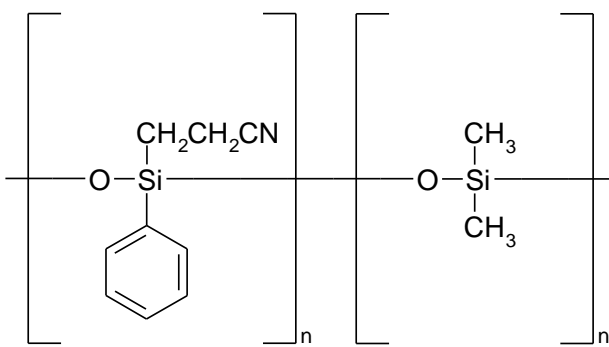
n=95%

poli(5% difenil/95% dimetilsilossano)

n=20%

n=80%

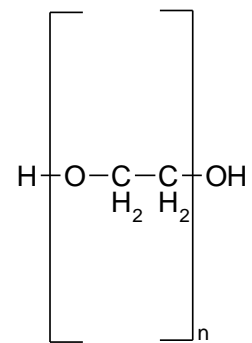
poli(20% difenil/80% dimetilsilossano)



n=6%

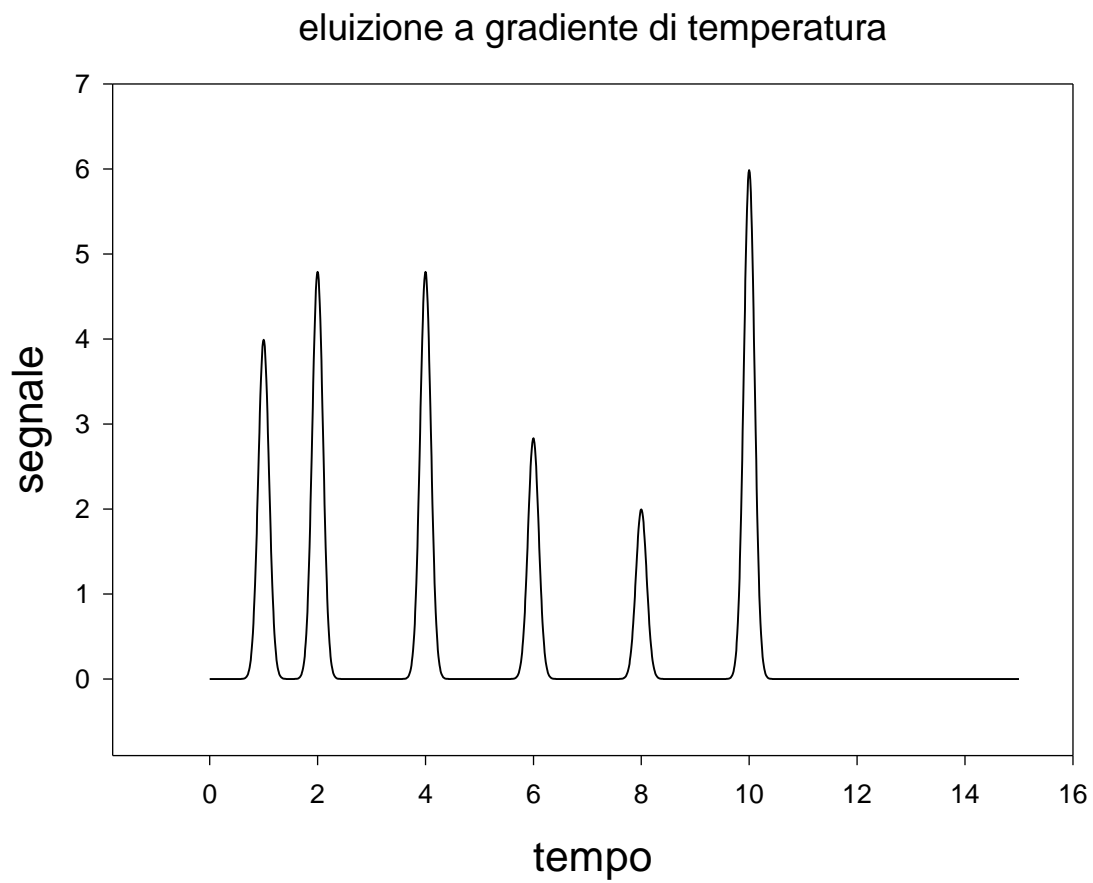
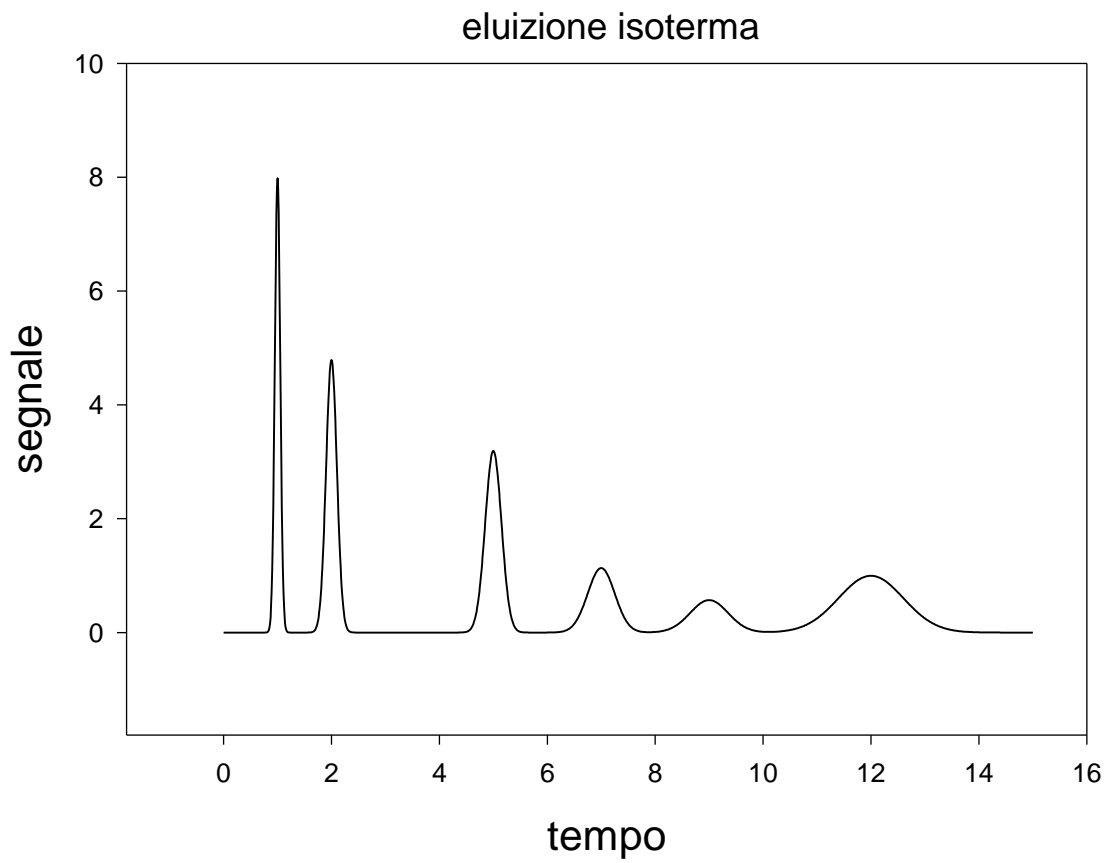
n=94%

poli(6% cianopropil/94% dimetilsilossano)



glicole polietilenico

	T massima (°C)	Formula chimica	Usi comuni
Squalano	100	2,6,10,15,19,23-esametil tertacosano	RIFERIMENTO Idrocarburi
OV-1, SE-30	350	Poli(metil dimetil silossano)	“general purpose”, bifenili
OV-7	350	Poli(fenil metil dimetil silossano)	“general purpose”, aromatici e olefine
OV-17, DC-710	300	Poli(fenil metil silossano)	Acidi grassi, esteri, aromatici
OV-25	350	Poli(fenil metil difenil silossano)	Acidi grassi, esteri, alcoli
Silan 5CP, SP 2300,	250	Poli(cianopropil fenil silossano)	Acidi grassi, esteri
Carbowax 20 M	225	Poli(etilene glicole)	Alcoli, esteri, chetoni
DEGS	200	Di Etilene Glicole Succinato	Acidi grassi, esteri, steroidi



RIVELATORI PER GC.

Durante lo sviluppo delle tecniche gascromatografiche sono state studiate e utilizzate decine di rivelatori soprattutto per valutarne le caratteristiche generali che idealmente dovrebbero essere le seguenti

1. Universalità. E' una caratteristica praticamente impossibile da trovare e talvolta anche non necessariamente fondamentale in quanto, in casi di sovrapposizioni di picchi sarebbe auspicabile avere selettività.
2. Alta sensibilità.
3. Buona stabilità a riproducibilità.
4. Una risposta lineare alla quantità di analita che si estenda per diversi ordini di grandezza.
5. Una temperatura di esercizio che vada da temperatura ambiente fino ad almeno 400°C.
6. Un tempo di risposta breve che risulti indipendente dal flusso.
7. Elevata affidabilità a facilità di uso. Per quanto possibile deve risultare indistruttibile anche nelle mani di operatori inesperti.
8. Fattori di risposta più o meno uniformi nei confronti di tutti gli analiti, oppure al contrario una sensibilità specifica a prevedibile verso una o più classi di composti.
9. Metodo di rivelazione non distruttivo.

È inutile sottolineare che nessun rivelatore possiede tutte queste caratteristiche, e sembra improbabile che un simile rivelatore possa mai essere progettato.

Tra i più utilizzati rivelatori si possono citare

1. A termo-conducibilità
2. A ionizzazione di fiamma
3. A cattura elettronica
4. Ad He metastabile ed a Ar metastabile
5. A emissione termoionica (NPD), N₂, He+H₂+Aria
6. A fotoionizzazione (PID), He, N₂.
7. A fotometria di fiamma (FPD), N₂, He+H₂+Aria
8. A spettrometria di massa
9. spettrofotometria FT-IR

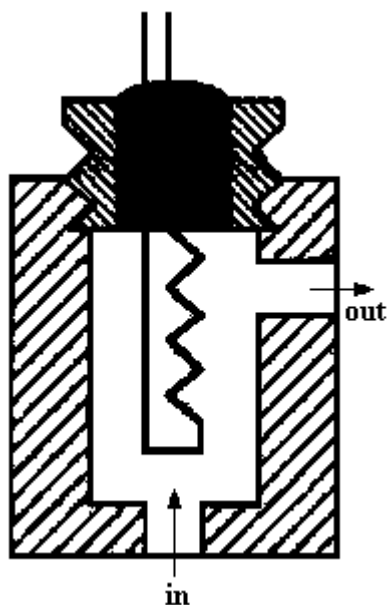
RIVELATORE A IONIZZAZIONE DI FIAMMA (FID)

Il rivelatore a ionizzazione di fiamma è uno dei rivelatori più diffusi e di uso più generale in gascromatografia. Consiste in un bruciatore dove il flusso in uscita dalla colonna viene miscelato con aria e idrogeno e poi bruciato in una fiamma preventivamente accesa elettricamente. La maggior parte dei composti organici, quando viene pirolizzata alla temperatura di una fiamma idrogeno/aria, genera ioni ed elettroni che possono condurre elettricità attraverso una fiamma. Tra l'ugello del bruciatore e l'elettrodo collettore posto appena sopra la fiamma viene applicata una differenza di potenziale di alcune centinaia di volt. La corrente generata ($\sim 10^{-12}$ A) viene inviata ad un amplificatore operativo ad elevata impedenza per la misura. La ionizzazione dei composti che contengono carbonio in una fiamma è un processo poco conosciuto anche se si è osservato che il numero di ioni prodotto è in prima approssimazione proporzionale al numero di atomi di carbonio ridotti presenti nella fiamma. Poiché un rivelatore a ionizzazione di fiamma risponde al numero di atomi di carbonio che entrano nel rivelatore per unità di tempo, esso risulta uno strumento sensibile alla massa, a non alla concentrazione. Di conseguenza questo rivelatore ha il vantaggio che una variazione nel flusso della fase mobile ha poco effetto sulla sua risposta. I gruppi funzionali come carbonili, idrossili, alogeni ed ammine generano nella fiamma pochi ioni, spesso nessuno. Le specie chimiche che non danno segnale FID sono: He, Ar, Kr, Ne, Xe, O₂, N₂, CS₂, H₂S, SO₂, NO, N₂O, NO₂, NH₃, CO, CO₂, H₂O, SiCl₄, SiHCl₃, SiF₄. Queste caratteristiche fanno del FID il rivelatore più diffuso per l'analisi di composti organici, inclusi quelli contaminati da acqua a ossidi di azoto a di zolfo. Il rivelatore a ionizzazione di fiamma presenta bassi limiti di rivelabilità ($\sim 10^{-13}$ g), un ampio intervallo di risposta

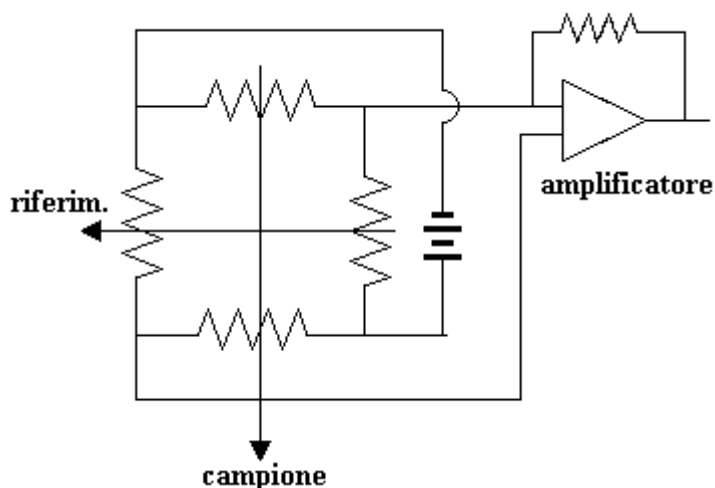
lineare (~ 7 ordini di grandezza), ed un basso rumore. È in genere robusto e semplice da usare. Uno svantaggio del rivelatore a ionizzazione di fiamma è che la rivelazione del campione è distruttiva.

RIVELATORE A CONDUCEBILITÀ TERMICA (TCD)

Uno dei primi rivelatori per gascromatografia si basa sulla variazione di conducibilità termica della corrente di gas di trasporto prodotta dalla presenza di molecole di analita. Questo strumento è talvolta detto catarometro. Il sensore del catarometro è costituito da un elemento scaldato elettricamente la cui temperatura, a potenza elettrica costante, dipende dalla conducibilità termica del gas che lo circonda. L'elemento riscaldato può essere un filo sottile di platino, oro o tungsteno oppure, in alternativa, un termistore a semiconduttore. La resistenza del filo o del termistore permette di fornire una misura della conducibilità termica del gas. Al contrario del filo di metallo, il termistore ha un coefficiente di temperatura negativo. La Figura mostra in sezione uno degli elementi che costituiscono il sensore di temperatura in un TCD.



La figura seguente rappresenta la disposizione degli elementi di risposta in un'unità di rivelazione.



Si utilizzano due coppie di resistenze, una coppia collocata nel flusso di corrente dell'eluente e l'altra nel flusso di gas prima del suo passaggio nella camera di iniezione del campione. In questo modo si annulla l'effetto dovuto alla conducibilità termica del gas di trasporto e si minimizzano gli effetti delle variazioni di flusso, di pressione e di potenza elettrica. Di solito si confrontano i valori delle due coppie di resistenze inserendole nei due rami di un semplice ponte di Wheatstone. Nel 1979 è stato messo a punto un rivelatore modulato di conducibilità termica costituito da un solo filamento; questo

strumento offre elevata sensibilità, non presenta deriva della linea di base e riduce il tempo di condizionamento. In questo caso le due correnti di gas, quella che trasporta gli analiti e quella di riferimento, passano alternativamente sopra un filamento minuscolo inserito in una cella di rivelazione in materiale ceramico, con un volume di soli 5 pL. Il dispositivo che permette di alternare il gas in entrata opera ad una frequenza di 10 Hz. Il segnale in uscita dal filamento è perciò un segnale elettrico a 10 Hz la cui ampiezza è proporzionale alla differenza in conducibilità termica tra i due gas. Poiché il circuito di amplificazione risponde solo a segnali che hanno una frequenza di 10 Hz, si elimina così gran parte del rumore termico del sistema.

La conducibilità termica di elio e idrogeno è circa da sei a dieci volte superiore a quella della maggior parte dei composti organici. La presenza perciò di quantità anche minime di molecole organiche diminuisce in modo sensibile la conducibilità termica del gas in uscita; di conseguenza si ha un aumento rilevabile della temperatura del rivelatore. La conducibilità di altri gas di trasporto è più vicina a quella delle molecole organiche; l'impiego di un rivelatore a conducibilità termica costringe a scegliere idrogeno o elio come gas di trasporto. Gli aspetti più vantaggiosi di un rivelatore a conducibilità termica sono la semplicità, il notevole intervallo di risposta lineare (circa 5 ordini di grandezza), la risposta generale verso i composti organici ed inorganici ed il fatto che non distrugge il campione. Il limite del catarometro è di $\sim 10^{-8}$ g di soluto per mL di gas di trasporto. Si deve sottolineare che la bassa sensibilità dei TCD spesso ne preclude l'uso con colonne capillari a causa delle quantità troppo piccole di analita introdotte per la separazione in questo tipo di colonne.

RIVELATORE TERMOIONICO (NPD)

Il rivelatore termoionico è un rivelatore selettivo nei confronti di composti organici contenenti fosforo e azoto. La sua risposta all'atomo di fosforo è circa 10 volte superiore rispetto a quella relativa all'atomo di azoto e $10^4 - 10^6$ volte maggiore rispetto all'atomo di carbonio. Se lo si confronta con il FID, il rivelatore termoionico è approssimativamente 500 volte più sensibile per molecole contenenti atomi di fosforo e 50 volte più sensibile per quelle che contengono atomi di azoto. Queste proprietà rendono il rivelatore termoionico particolarmente utile per rivelare e determinare quantitativamente i pesticidi che contengono atomi di fosforo.

Un rivelatore termoionico è simile nella struttura a quello di ionizzazione di fiamma. La fase mobile dalla colonna viene miscelata con l'idrogeno, passa attraverso l'ugello del bruciatore dove avviene la combustione. Il gas riscaldato fluisce in un elemento cavo di silicato di rubidio riscaldato elettricamente, mantenuto a circa 180 V rispetto al collettore. L'elemento riscaldato forma così un plasma che ha una temperatura tra 600 a 800°C. Non si sa con precisione per quale fenomeno nel plasma si generi un flusso molto elevato di ioni generati dagli atomi di azoto e fosforo, comunque la corrente ionica totale è molto elevata e può determinare composti che contengono questi due elementi.

RIVELATORE A CATTURA DI ELETTRONI (ECD)

Il rivelatore a cattura di elettroni opera in modo molto simile a quello di un contatore proporzionale per la misura di raggi X. In questo strumento la fase mobile proveniente dalla colonna passa sopra un emettitore β , come il nichel-63 o il tritio (adsorbito su un foglio di platino o di titanio). Gli elettroni emessi dall'emettitore provocano la ionizzazione del gas di trasporto (spesso azoto) e la produzione di un flusso di elettroni. In assenza di specie organiche da questo processo di ionizzazione si genera una corrente stazionaria costante tra una coppia di elettrodi. In presenza però di molecole organiche disponibili a catturare elettroni, la corrente tende a diminuire. La risposta non è però lineare a meno che non si impieghi nel rivelatore un potenziale pulsato.

Il rivelatore a cattura di elettroni è molto sensibile specialmente nei confronti di quelle molecole che posseggono un gruppo elettrone attrattore come un alogeno, un perossido, un chinone ed un nitrogruppo. Non rivela invece i composti come alcoli, ammine e idrocarburi. Un'applicazione importante del rivelatore a cattura di elettroni è quella della determinazione di insetticidi clorurati. Gli ECD hanno elevata sensibilità e possiedono il pregio di non alterare in modo significativo i campioni. D'altra parte l'intervallo di risposta lineare è di solito limitato a circa due ordini di grandezza.

RIVELATORE A EMISSIONE ATOMICA (AED)

Questo rivelatore si basa sulla spettroscopia di emissione atomica. In questo dispositivo l'eluito è in un plasma di elio alimentato a microonde accoppiato ad uno spettrometro di emissione atomica a serie di diodi. Il plasma ha energia sufficiente per atomizzare tutti gli elementi presenti in un campione ed eccitarli in modo da generare i loro spettri caratteristici di emissione atomica. Si osservano questi spettri mediante uno Spettrometro che utilizza una serie di diodi piana e in grado di spostarsi sul piano focale, capace di rivelare radiazioni emesse tra 170 a 780 nm. La serie di diodi si può posizionare per rivelare simultaneamente da due a quattro elementi in ogni posizione possibile. Allo stato attuale il programma che gestisce il rivelatore è in grado di misurare la concentrazione di 15 elementi. Probabilmente in un prossimo futuro lo sviluppo del software permetterà la rivelazione di altri elementi.

RIVELATORE A FOTOMETRIA DI FIAMMA (FPD)

Il rivelatore a fotometria di fiamma è molto usato nell'analisi di inquinanti atmosferici e dell'acqua, pesticidi e prodotti di idrogenazione del carbone. È un rivelatore selettivo che risponde principalmente a composti che contengono zolfo e fosforo. In questo rivelatore l'eluito passa attraverso una fiamma aria/idrogeno a bassa temperatura che converte parte del fosforo in una specie HPO che emette bande in una zona compresa tra 510 a 526 nm. Lo zolfo presente nel campione viene trasformato in S₂ che emette una banda centrata a 394 nm. Con filtri adatti si isolano queste emissioni e se ne misura l'intensità con metodi fotometrici. Tra gli altri elementi rivelabili per fotometria di fiamma vi sono alogeni, azoto e molti metalli come stagno, cromo, selenio e germanio.

RIVELATORE A FOTOIONIZZAZIONE (PID)

Nel rivelatore a fotoionizzazione (PID) l'eluito viene irradiato con un fascio intenso di luce ultravioletta con un'energia variabile da 8,3 a 11,7 eV ($\lambda = 149-106$ nm), che provoca la ionizzazione delle molecole. L'applicazione di una differenza di potenziale attraverso la cella che contiene gli ioni emessi genera una corrente ionica che può essere amplificata e registrata.

ACCOPIAMENTO TRA GC E TECNICHE SPETTROSCOPICHE

La gascromatografia è spesso accoppiata con alcune tecniche spettroscopiche ed elettrochimiche. Ne risultano i cosiddetti metodi accoppiati (hyphenated methods) che danno ai chimici un mezzo molto efficace per identificare i componenti di una miscela complessa. Nei primi sistemi di accoppiamento gli eluiti venivano raccolti dalla colonna cromatografica come frazioni distinte in una trappola fredda dopo essere passati da un rivelatore generale a non distruttivo. Ciascuna frazione veniva poi sottoposta all'analisi mediante risonanza magnetica nucleare, spettrometria di massa, spettroscopia infrarossa, o misure elettro-analitiche. Una limitazione fondamentale di questo tipo di approccio era la quantità assai piccola (spesso micromolare) di soluto contenuta in ciascuna frazione. Nonostante ciò, questa procedura si è dimostrata in genere utile per l'analisi qualitativa di miscele multicomponenti.

Un secondo metodo generale, che trova oggi ampia diffusione, sfrutta rivelatori basati su tecniche spettroscopiche o elettro-analitiche che seguono in continuo la fase mobile in uscita dalla colonna. In generale queste procedure richiedono un controllo della strumentazione da parte di un microprocessore e necessitano di un sistema di memorizzazione per conservare i dati spettrali da visualizzare in seguito separatamente come spettri e cromatogrammi.

GASCROMATOLOGRAFIA/SPETTROMETRIA DI MASSA (GC/MS)

Molte ditte produttrici di apparecchiature scientifiche offrono strumentazioni per gascromatografia che sono direttamente accoppiate a spettrometri di massa a scansione rapida di vario tipo. La velocità di flusso utilizzata per le colonne capillari è in genere sufficientemente bassa perché l'uscita della colonna possa essere direttamente immessa nella camera di ionizzazione di uno spettrometro di massa. La maggior parte degli spettrometri di massa a quadrupolo o a settore magnetico vengono venduti già predisposti per l'accoppiamento con gascromatografi. A colonne di ripartizione gas-

liquido possono essere accoppiati anche spettrometri di massa a trasformata di Fourier. Per questo tipo di applicazioni risultano molto utili le caratteristiche di velocità ed elevata sensibilità proprie di questa strumentazione.

All'inizio degli anni '70 apparvero sul mercato molti spettrometri di massa progettati proprio come rivelatori per gascromatografia. In genere sono spettrometri quadrupolari molto compatti, che sono molto meno costosi e più semplici nell'uso e nella manutenzione rispetto agli spettrometri di massa multiuso.

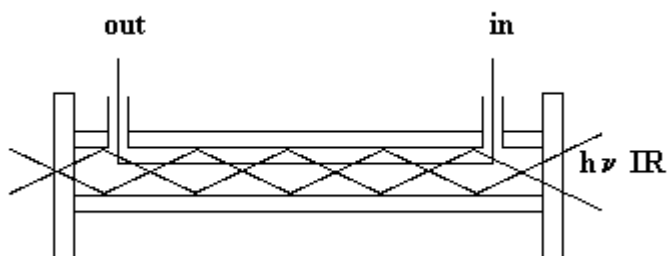
Lo spettrometro di massa più semplice utilizzabile in gascromatografia è il rivelatore a trappola ionica (ITD). In questo strumento gli ioni generati dal campione eluito mediante impatto elettronico o ionizzazione chimica vengono mantenuti in un campo di radiofrequenze. Gli ioni intrappolati vengono poi inviati dall'area dove sono conservati al rivelatore che è un elettromoltiplicatore. È possibile controllare l'invio degli ioni al rivelatore realizzando una scansione funzione del loro rapporto massa/carica. Il rivelatore a trappola ionica è molto meno costoso e più compatto degli strumenti quadrupolari.

I rivelatori a spettrometria di massa possono presentare i dati in vari modi e possono essere divisi in due modalità: in tempo reale e dopo elaborazione elettronica. All'interno di ciascuna delle due modalità vi è la possibilità di avere cromatogrammi basati sulla corrente ionica totale (un grafico della somma di tutti i segnali acquisiti per ciascuno ione in funzione del tempo) oppure cromatogrammi dalla corrente di ioni selezionati (un grafico della corrente relativa a uno o più ioni in funzione del tempo), oppure di vedere gli spettri di massa dei vari picchi. Gli spettri di massa in tempo reale appaiono sullo schermo dell'elaboratore con una scala utile per ricavare i valori di massa; in questo caso i cromatogrammi relativi possono apparire sullo schermo oppure essere seguiti come una traccia registrata in tempo reale. Dopo che è terminata la separazione i cromatogrammi elaborati dal computer possono apparire sullo schermo o essere stampati. Gli spettri di massa elaborati per ogni picco possono, anch'essi, essere richiamati sullo schermo o stampati. Alcuni strumenti sono inoltre dotati di biblioteche di spettri di riferimento memorizzate per facilitare l'identificazione dei composti.

Sono state usate strumentazioni per gascromatografia/spettrometria di massa per identificare centinaia di composti presenti in sistemi naturali e biologici. Per esempio l'uso di questa tecnica ha permesso la caratterizzazione dei componenti responsabili dell'aroma e del sapore nei cibi, l'identificazione di inquinanti in matrici acquose, diagnosi mediche basate sulla composizione dell'aria riemessa dai polimeri a studi sui metaboliti dei farmaci.

GASCROMATOGRAFIA/SPETTROSCOPIA INFRAROSSA

L'accoppiamento di un gascromatografo a colonne capillari con uno spettrometro infrarosso a trasformata di Fourier (GC-FTIR) fornisce un mezzo efficace per separare ed identificare i componenti di miscele complesse. Come accade per i sistemi GC/MS, il collegamento tra la colonna e rivelatore costituisce il punto critico del sistema. Per risolvere questo problema generalmente si connette alla colonna mediante un tubicino una guida di luce, cioè una sottile cella tubolare a pareti riflettenti, lunga da 10 a 40 cm a con un diametro interno variabile da 1 a 3 mm. Questa cella, il cui schema viene presentato in Figura

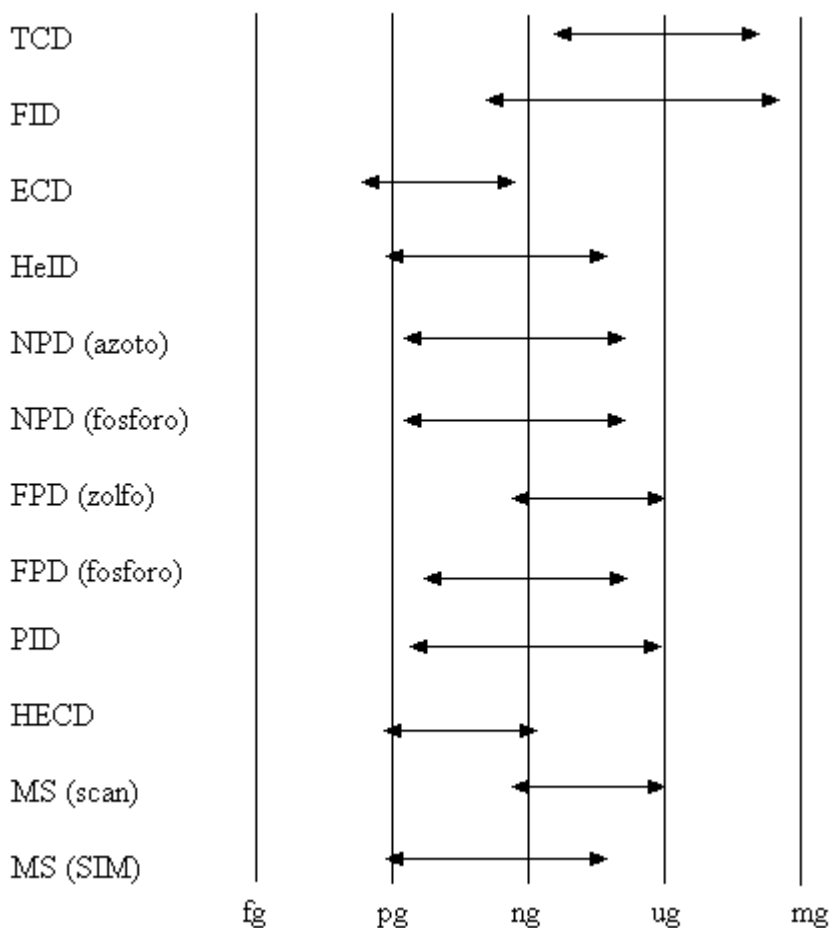


consiste di un tubo in Pyrex rivestito internamente d'oro. La radiazione viene trasmessa per riflessione multipla sulle pareti a specchio. La cella può essere riscaldata per evitare che i componenti possano

condensare. Il disegno di questo modello di guide di luce serve per massimizzare il cammino ottico, aumentando così la sensibilità, rendendo minimo invece il volume morto che porta ad un allargamento delle bande cromatografiche. Si usano in genere rivelatori IR a tellururo di cadmio e mercurio (MCT), raffreddati ad elio liquido, che offrono un'elevata sensibilità. Il periodo in cui lo spettrometro effettua scansioni viene deciso in base alla comparsa di un picco segnalato da un rivelatore non distruttivo per cromatografia; l'inizio di una serie di scansioni ha luogo dopo un breve intervallo di tempo per permettere al componente di raggiungere, dalla zona del rivelatore, la cella infrarossa. I dati spettrali vengono digitalizzati e memorizzati in un elaboratore dal quale si possono poi stampare gli spettri acquisiti.

Si possono incontrare difficoltà nel confrontare gli spettri del gas effluente da una colonna cromatografica con quelli che si trovano in letteratura, relativi a campioni solidi o liquidi. Gli spettri in fase gassosa presentano anche la struttura fine rotazionale, assente invece negli spettri registrati su campioni allo stato liquido o solido; di conseguenza vi possono essere differenze significative nella forma generale dello spettro. Un altro aspetto che differenzia gli spettri di composti in fase gassosa da quelli in fase liquida è l'assenza di alcune bande dovute ad interazioni intermolecolari, quale ad esempio il legame ad idrogeno in alcoli e acidi. Come per i sistemi GC/MS, sono disponibili biblioteche di spettri di riferimento digitalizzati per poter elaborare l'enorme massa di dati che sono prodotti da strumentazioni GC/FTIR, anche nel caso di campioni relativamente semplici.

I due schemi riportati di seguito riassumono alcune caratteristiche dei rivelatori per GC.



Rivelatore	Selettività	Linearità	DL	T max. °C	Gas	Distruttivo	Sens. a
TCD	Univ.	4 ord.	10 ng	450	He	No	Conc.
GDBD	Univ.	3 ord.	10 ng	150	He	No	Conc.
FID	Organici	7 ord.	0.5 ng	400	He, N ₂	Si	Massa
ECD	Elevata	2-3 ord.	0.1 pg	225,350	Ar, N ₂	No	Conc.
NPD	P	4 ord.	1 pg	300	He, N ₂	Si	Massa
	N	4 ord.	10 pg	300			
HeID	Univ.	4 ord.	1 pg	100	He	No	Conc.
FPD	S	3 ord.	1 pg	350	He, N ₂	Si	Conc.
	P	4 ord.	10 pg	350			
PID	Univ.	6 ord.	5 ng	300	He, N ₂	No	Conc.
HECD	Elevata	3 ord.	1 pg	250	He, N ₂	Si	Massa

CROMATOGRAFIA LIQUIDA

1. fase normale: la polarità dell'eluente è minore di quella della fase stazionaria; è una cromatografia di tipo liquido solido.
2. fase inversa: la polarità dell'eluente è maggiore di quella della fase stazionaria; è una cromatografia di tipo liquido-fase legata liquida

Per la fase normale le fasi stazionarie possono essere: SiO₂, Al₂O₃ in granuli da 5-10 µm porosi o da 20-40 µm pellicolari. Il tipo di interazione tra fase stazionaria e soluto è di tipo dipolo-dipolo e/o con legami ad H o forze di Van der Waals.

Le fasi mobili sono solventi organici (esano, toluene, ecc.) con diversa polarità che agiscono come antagonisti dell'analita nei confronti dei siti attivi.

$$p S_m + n M_{ads.} = p S_{ads.} + n M_m$$

All'aumentare della polarità degli analiti aumentano i tempi di ritenzione.

All'aumentare della polarità dell'eluente diminuiscono i tempi di ritenzione.

In questo tipo di cromatografia mai usare acqua che disattiva i siti della colonna. In certi casi è necessaria una riattivazione che è di tipo termico (appunto per desorbire l'acqua).

solvente	ε
n-pentano	0.00
Iso-ottano	0.01
Ciclosano	0.04
Tetracloruro di carbonio	0.18
Xilene	0.26
Toluene	0.29
Benzene	0.32
Cloroformio	0.40
Diclorometano	0.42
Tetraidrofurano	0.45
Acetone	0.56
Acetato di etile	0.58
Anilina	0.62
Acetonitrile	0.65

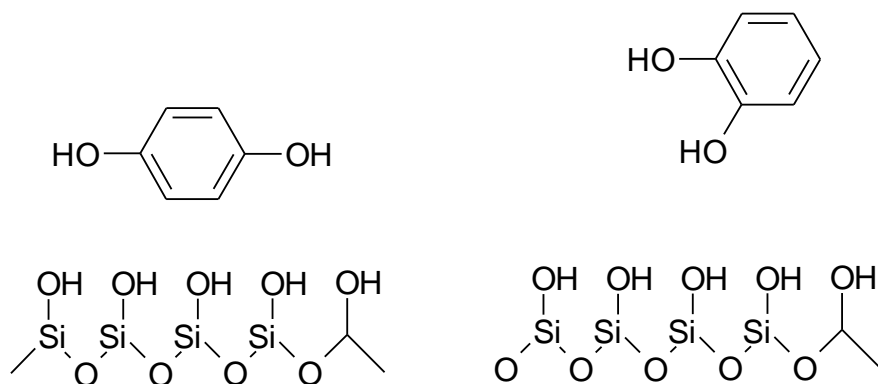
Isopropanolo	0.82
Etanolo	0.88
Metanolo	0.95
Acido acetico	Grande

ϵ è una misura del calore di adsorbimento.

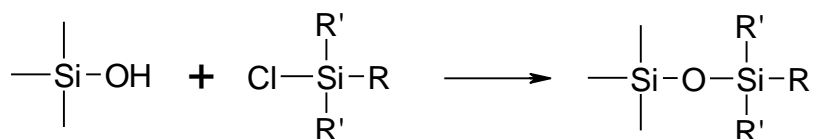
Le classi di composti separabili con questo tipo di cromatografia è:

1. idrocarburi fluorurati
2. idrocarburi saturi
3. olefine
4. idrocarburi aromatici
5. eteri
6. nitroderivati
7. esteri, chetoni, aldeidi
8. alcoli, ammine
9. amidi
10. acidi carbossilici

La cromatografia L-S si presta bene alla separazione di isomeri piuttosto che alla separazione di una serie omologa. Lo schema di orientazione delle molecole di orto e para idrochinone sono mostrate in figura.



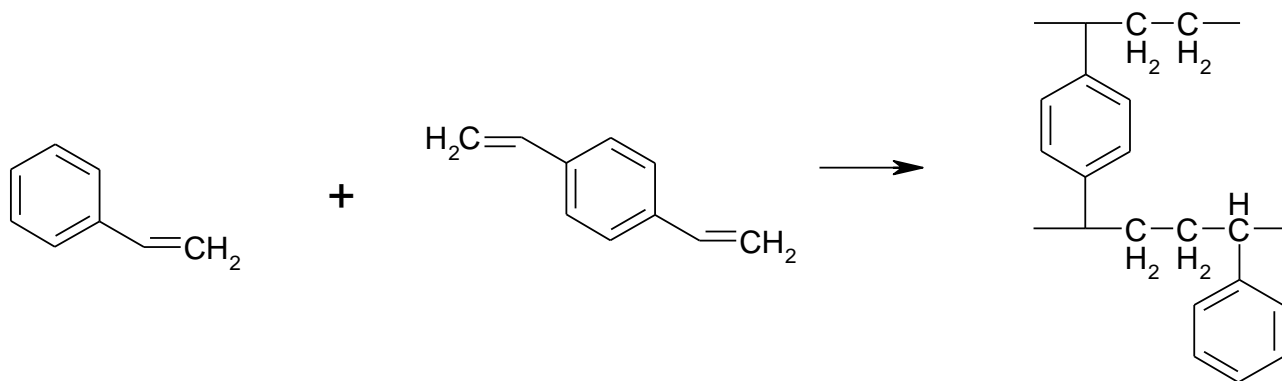
Per la cromatografia in fase inversa la fase stazionaria liquida viene legata ad un supporto solido costituito da granuli di 5-10 μm tipicamente di silice (ma non solo) per mezzo di una reazione di silanizzazione



Per realizzare colonne apolari $\text{R}' = -\text{CH}_3$ mentre $\text{R} = -\text{C}_8\text{H}_{17}$ oppure $\text{R} = \text{C}_{18}\text{H}_{37}$. Per colonne debolmente polari $\text{R} = -\text{C}_6\text{H}_5$, mentre per colonne polari $\text{R} = -\text{C}_2\text{H}_4\text{CN}$, $\text{R} = -\text{C}_2\text{H}_4\text{OH}$, $\text{R} = -\text{C}_2\text{H}_4\text{NH}_2$.

Su supporto di silice l'intervallo di stabilità di pH è normalmente tra 2 e 8. Per $\text{pH} < 2$ si ha l'idrolisi del legame Si-C, mentre per $\text{pH} > 8$ si ha dissoluzione della silice. Per limitare questi problemi si effettua la procedura di "end capping" che consiste nel saturare tutte le funzioni silanoliche per mezzo di una molecole piccola si tetrametil clorosilano.

Un supporto alternativo alla silice è un copolimero stirene-divinil benzene a vario grado di cross-linking.



Anch'esso può essere derivatizzato con diversi gruppi funzionali tra cui catene alchiliche con ammine o ossidril terminali.

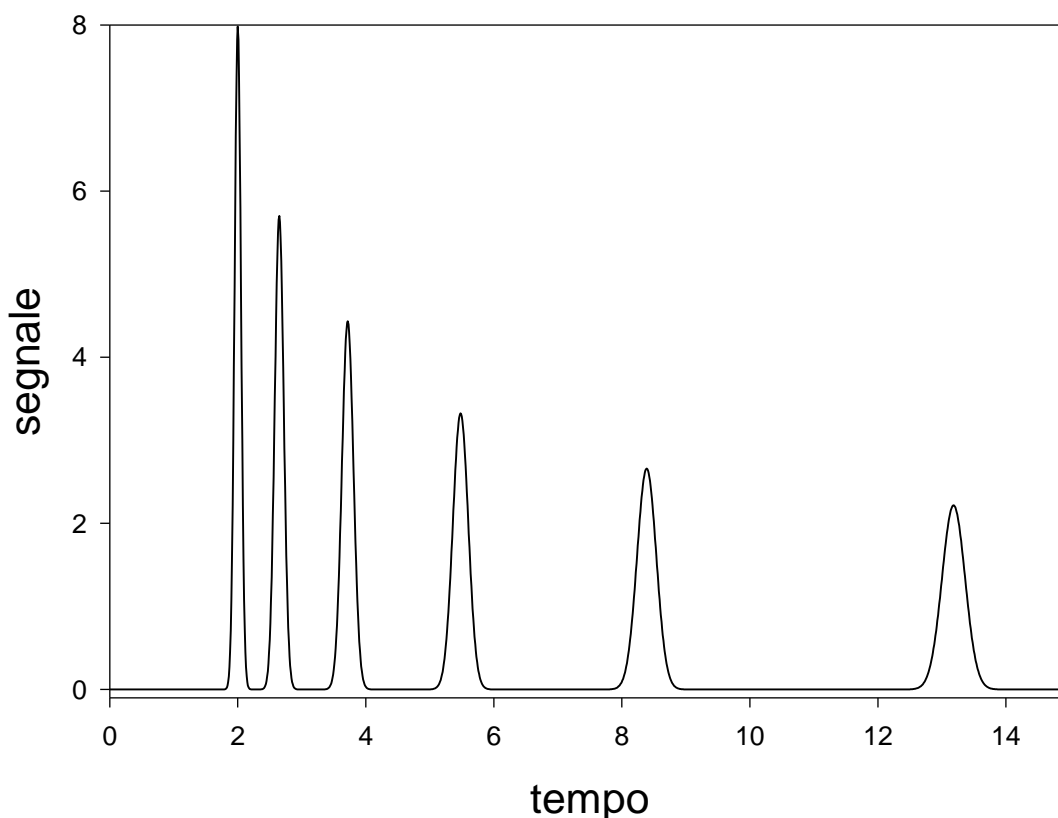
L'interazione tra fase stazionaria soluto e fase mobile si realizza per mezzo della formazione di dipoli indotti, di interazione tra dipoli permanenti, di legami H

La serie eluotropa per questo tipo di fasi è:

1. Tetraidrofurano
2. acetonitrile
3. metanolo
4. acqua

All'interno di una serie omologa la ritenzione dipende dalla lipoficità dell'analita. Un esempio è quello della figura seguente.

ipotetico cromatogramma di una miscela di 6 aldeidi della serie omologa $H(CH_2)_nCHO$ ($n=0-5$)

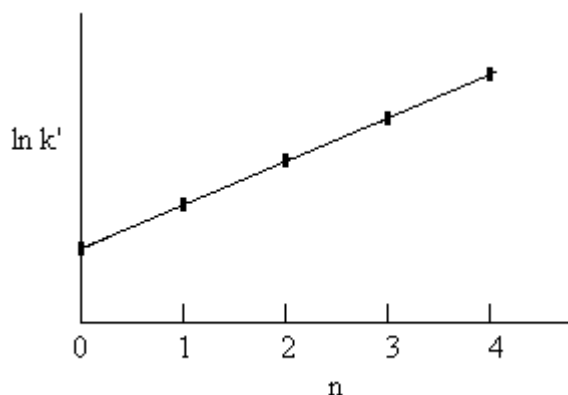


Si può notare che l'andamento del logaritmo della costante di capacità contro il numero di atomi di carbonio è rettilineo (vedi figura)

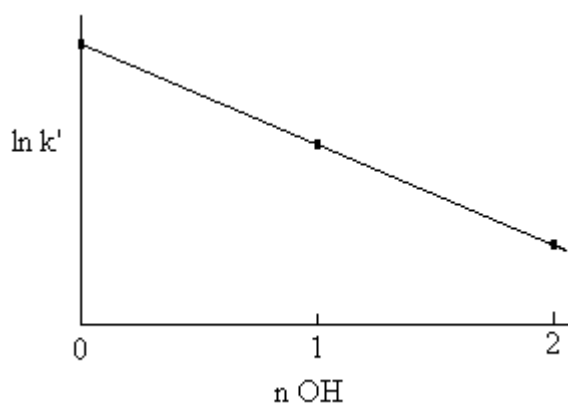
$$\ln k' = q + c * n$$

$$\ln k'_2 - \ln k'_1 = \cos t$$

$$\ln \frac{k'_2}{k'_1} = \cos t = \ln \alpha$$

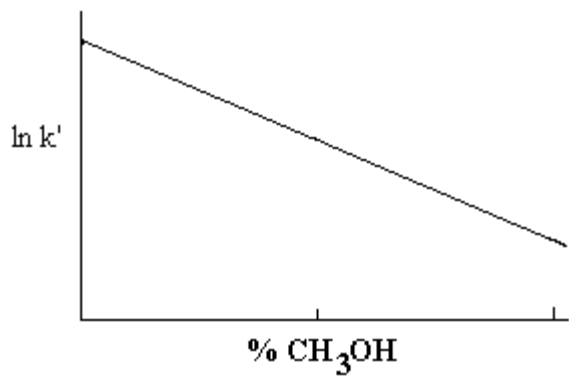


Gruppi diversi presentano selettività diverse ed in particolare $\text{CH}_2 > \text{Cl} > \text{NO}_2 > \text{CN} > \text{CHO} > \text{OH} > \text{COOH}$. Nel caso degli acidi succinico, tartarico e malico si ha il diagramma della figura seguente che implica tempi di ritenzione decrescenti per la sequenza data.

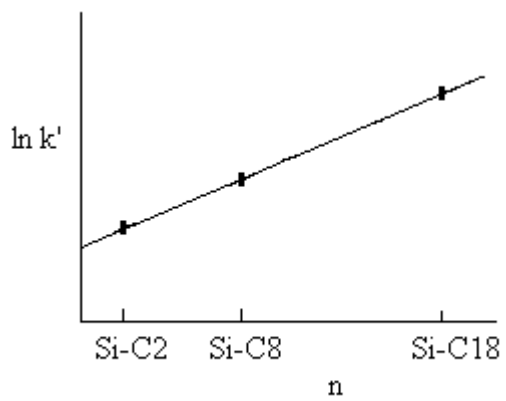


La selettività della fase mobile, S, si ottiene ancora da una relazione di tipo lineare tra $\ln k'$ e la percentuale di modificatore organico, x .

$$\ln k' = \ln k'_{aq} - S * x$$

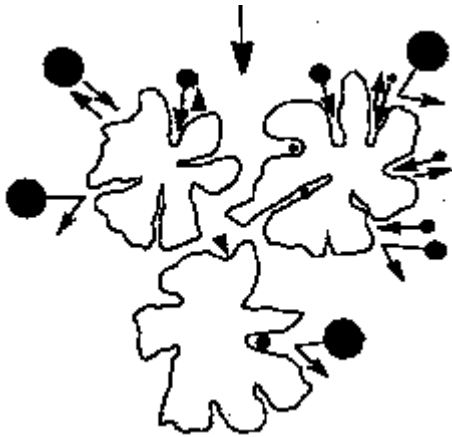


Ancora, la selettività della fase stazionaria, S, si ottiene ancora da una relazione di tipo lineare tra $\ln k'$ ed il numero di atomi di C che costituiscono la fase.



CROMAROGRAFIA DI ESCLUSIONE

Separa i soluti sulla base alle dimensioni ovvero al loro peso molecolare. La fase è di solito costituita da un polimero poroso in cui la dimensione dei pori è controllata. Questo tipo di cromatografia permette di determinare il P.M. previa calibrazione.



Rappresentazione dell'esclusione dimensionale di soluti di diversa dimensione dai pori di granuli di fase stazionaria.

In questo caso si definisce un volume vuoto della colonna, V_0 , un volume dei pori, V_p e un volume dei pori utilizzato dal soluto, V_A . Si ha

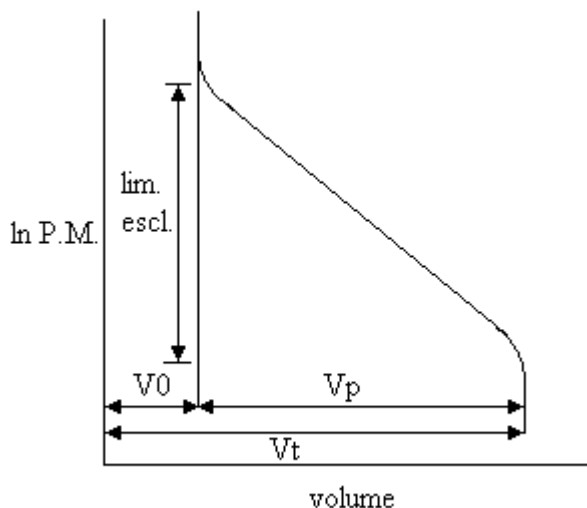
$$V_A = k * V_p \quad \text{con } 0 \leq k \leq 1$$

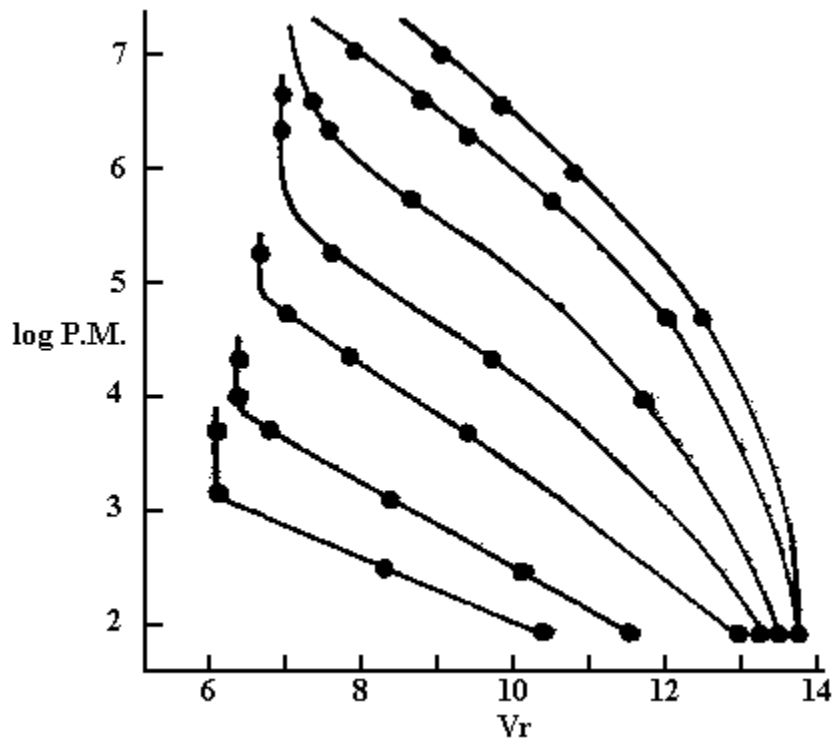
$k=0$ significa esclusione totale e cioè le molecole sono così grandi da non penetrare nei pori ed escono quindi con il volume morto (vuoto) della colonna.

$k=1$ significa permeazione totale e cioè le molecole sono così piccole da penetrare tutti i pori ed escono quindi con il volume "massimo" della colonna. In entrambi questi casi la separazione non è ottimale, mentre lo è per

$$V_A = k_A * V_p + V_0$$

cioè, data una colonna il volume di ritenzione è sempre compreso tra V_0 e V_p . In pratica ogni colonna è caratterizzata da un comportamento del tipo mostrato in figura

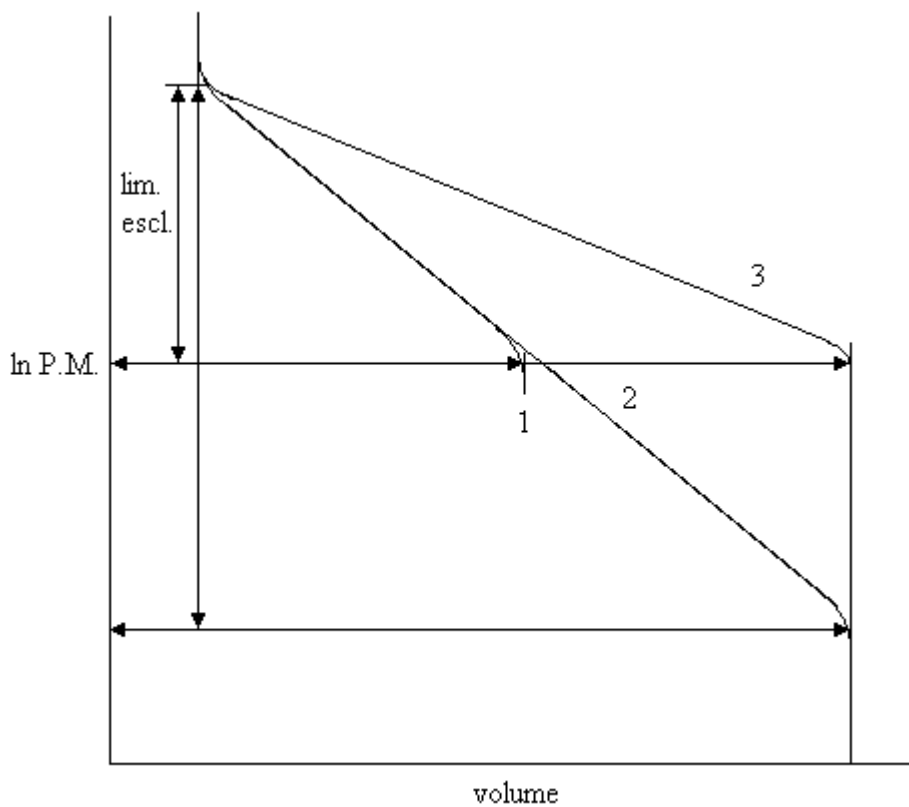




Con questo tipo di colonne si può lavorare anche i modalità bimodale e cioè si possono usare

1. due colonne uguali per aumentare la risoluzione in quanto aumenta l'efficienza;
2. due colonne a porosità diversa per ampliare l'intervallo lineare di pesi molecolari risolvibili.

Queste situazioni sono evidenziale nella figura seguente.



1. Colonna singola a porosità grande
2. due colonne in serie a porosità diversa
3. due colonne in serie di uguale porosità

L'interazione tra fase fasi e soluto teoricamente nulla anche se non è proprio così.

Il solvente può agire come modificatore delle dimensioni del soluto per solvatazione.

Le fasi stazionarie sono di solito costituite da gel di silice (solide), da copolimeri di stirene-divinilbenzene a diverso grado di cross-linking (semirigide), polisaccaridi (soft) per i quali la HPLC è proibita.

Le fasi mobili sono costituite da acqua con sali disciolti (gel-filtration) o solventi organici, THF, toluene, CHCl_3 , ecc. (gel-permeation).

La temperatura di esercizio può essere maggiore di quella ambiente per diminuire la viscosità della soluzione.

CROMATOGRAFIA A COPPIA IONICA

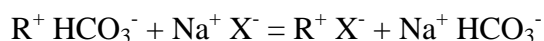
Con la fase inversa è possibile separare anche analiti ionici purché si realizzi una coppia ionica in soluzione. Di norma questa coppia ionica è realizzata con l'utilizzo dello ione tetrabuttilammonio per l'accoppiamento con anioni e perclorato, tetrafenil borato o alchilsolfonati organici per cationi.

CROMATOGRAFIA IONICA

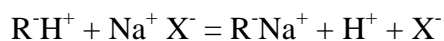
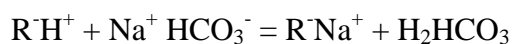
La cromatografia ionica è la tecnica che permette la separazione di ioni e molecole ionizzate o ionizzabili per interazione con un substrato a sua volta ionico. La sua utilizzazione ha permesso di determinare non solo sostanze estremamente scomode come SO_4^{2-} , NH_4^+ , F^- , PO_4^{3-} , Cl^- , ecc., ma ha trovato migliaia di applicazioni in molti campi. La cromatografia ionica affonda le proprie origini nei lavori degli anni '40 a '50 riguardanti la sintesi di nuove resine di scambio ionico ed allo studio delle loro proprietà chimico-fisiche. A dispetto di questa precocità di indagine sui meccanismi di scambio ionico la HPIC è stata introdotta nella normale pratica della chimica analitica solo nel 1975 quando Small, Stevens e Bauman per primi costruirono il primo cromatografo ionico commerciale. Questo fatto è attribuibile all'alta tecnologia necessaria per costruire questo cromatografo ed in particolare le resine di scambio ionico ed il rivelatore conduttimetrico. Il tipo di chimica che avviene è:



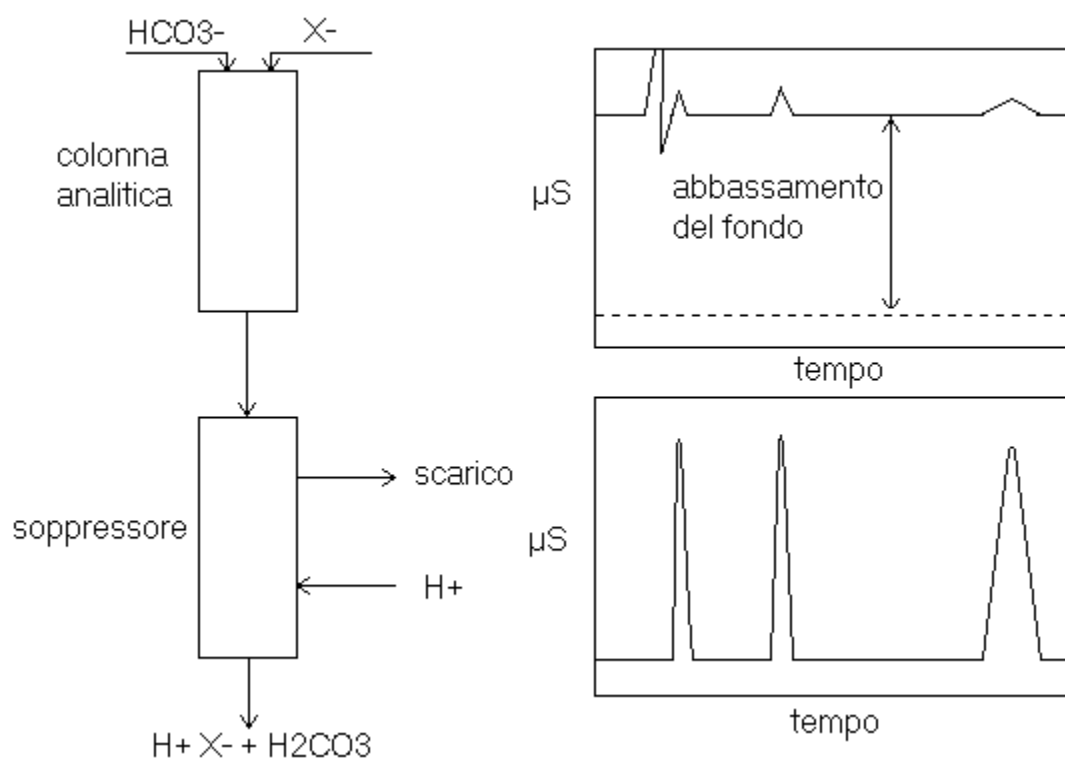
Queste due reazioni di scambio ionico sono caratterizzate dalle corrispondenti costanti che determinano l'affinità dell'analita per la fase stazionaria. Le equazioni scritte evidenziano la necessità di avere un eluente ionico i cui anioni siano competitivi nella ritenzione con quelli del campione. Inoltre è importante che esso sia eliminato prima di entrare nel rivelatore in quanto le misure di conducibilità non sono specifiche e sono misure massive cioè che descrivono la totalità della soluzione. L'eliminazione dell'eluente è una soppressione chimica che prevede l'impiego di un apparato analogo a quello usato per la separazione ma in cui si avrà lo scambio dei controioni. Nel caso della eluizione di anioni l'eluente deve essere quindi una base debole. A titolo di esempio si consideri lo ione bicarbonato:



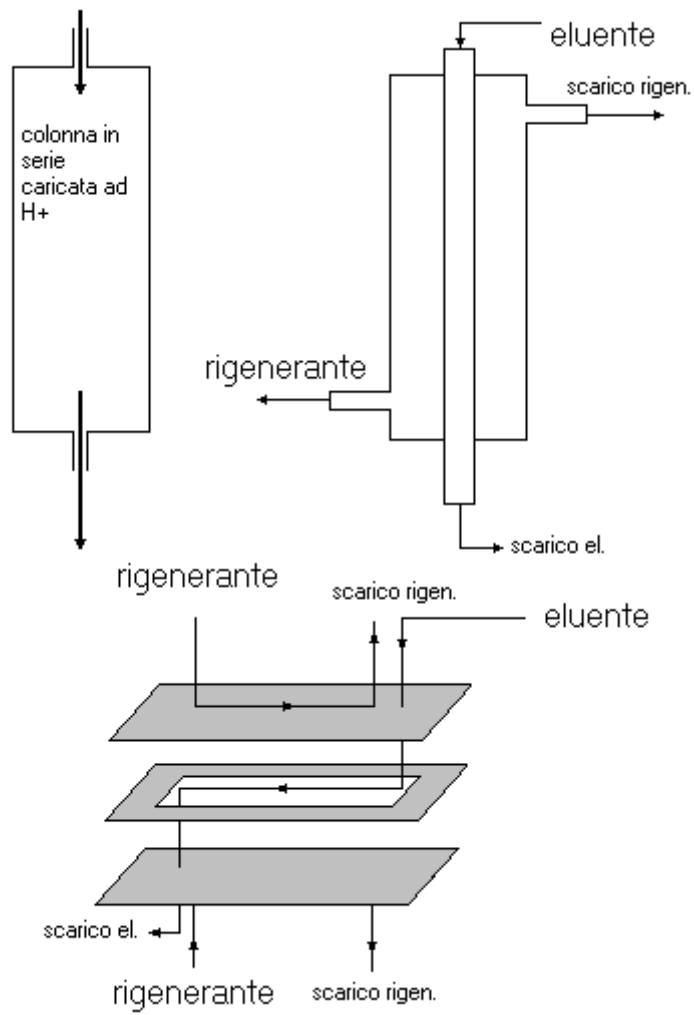
Nel soppressore avviene questo:

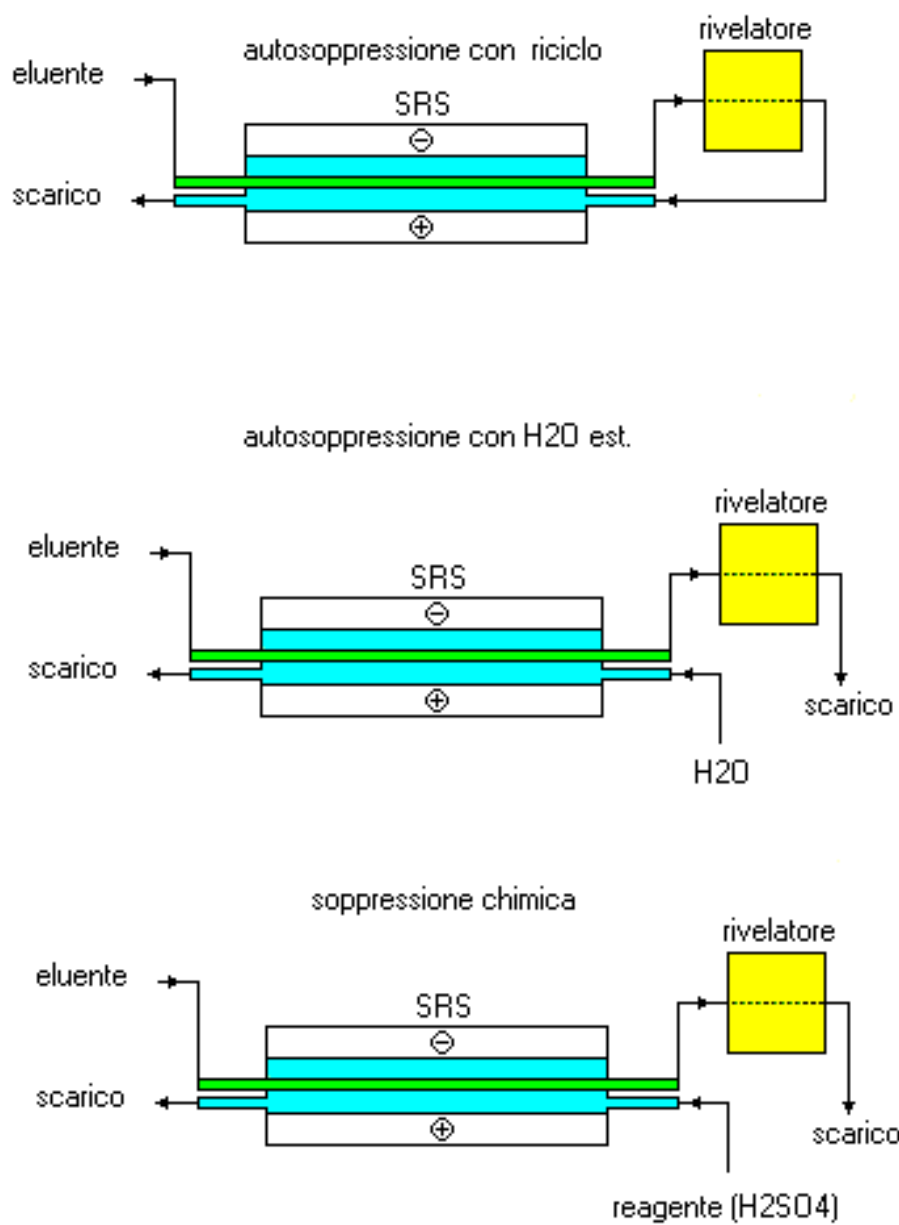


Da queste reazioni si può vedere che non solo si ha un abbattimento della conducibilità del fondo con una maggiore stabilità della linea di base a quindi un minore limite di rivelabilità, ma anche si ha un forte aumento del segnale dovuto al fatto che l'anione X⁻ esce con un controione, H⁺, che è caratterizzato da un'altissima conducibilità equivalente.

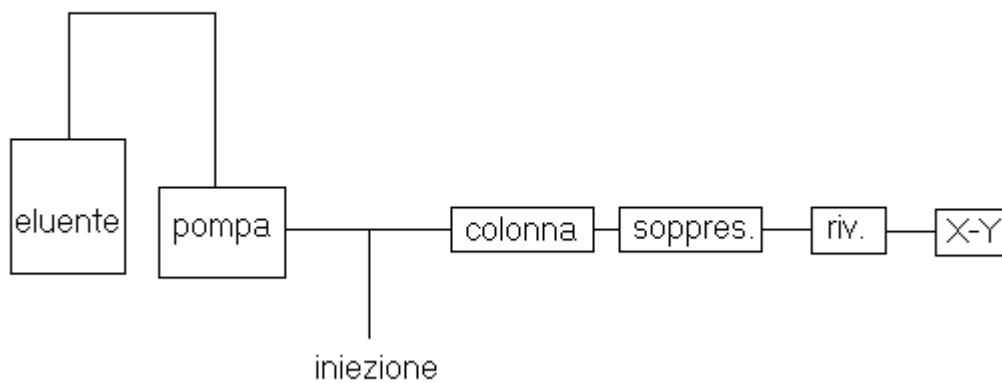


Nel corso degli anni si è passati dai soppressori a colonna a quelli a fibra cava a quelli a micromembrana a quelli a micromembrana autorigeneranti che sono quelli di ultima generazione (vedi figure)

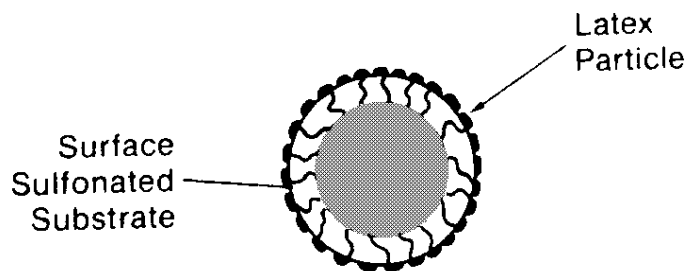




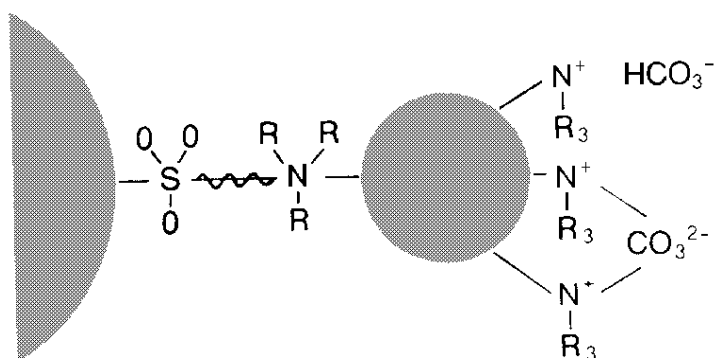
Lo schema di questo cromatografo è leggermente diverso da quello schematizzato per l'HPLC infatti, accanto alla colonna analitica, prevede una seconda colonna detta di soppressione. Un cromatografo può essere schematizzato in questo modo:



Il materiale di riempimento delle colonne facendo riferimento ad una colonna anionica cioè adatta a separare anioni è mostrato in figura.



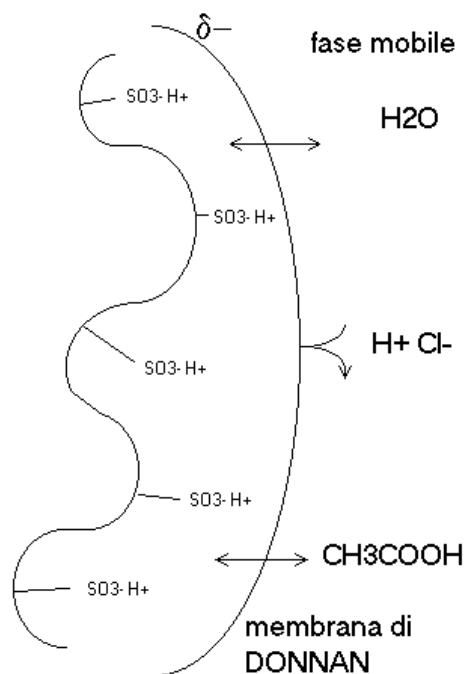
Latex-Anion Exchange Particle



Negli ultimi anni '70 la HPIC fu applicata per la prima volta all'analisi organica. La necessità di determinare quantitativamente acidi organici debolmente ionizzati portò allo sviluppo di una tecnica di separazione cromatografica basata sul principio dell'esclusione ionica (HPICE) fenomeno già da tempo conosciuto. Come risultato dell'esclusione di Donnan, acidi minerali forti non sono trattenuti dalla fase stazionaria e sono eluiti col volume morto in un singolo picco. Al contrario, le specie indissociate, che non sono affette da esclusione di Donnan, possono penetrare nei pori della resina e sono così ritardate. Questa tecnica fa quindi uso di interazioni di van der Waals tra il soluto e la fase stazionaria. Più in particolare il processo di separazione, che ha luogo sulla superficie di una resina totalmente solfonata, coinvolge tre differenti principi:

- l'esclusione di Donnan;
l'esclusione sterica;
l'assorbimento.

La figura mostra i gruppi solfonici legati alla superficie della resina e lo schema del processo di separazione in una colonna da HPICE. Quando viene pompata acqua essa costruisce sfere di idratazione attorno ai gruppi solfonici.



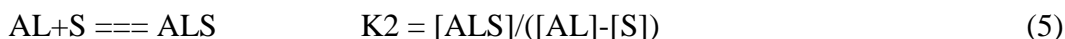
Queste molecole d'acqua sono quindi più orientate di quelle presenti nel bulk della soluzione. Nella figura il guscio di idratazione è rappresentato da un'ipotetica membrana caricata negativamente, la membrana di Donnan. Questa membrana è permeabile solo a specie neutre e quindi un eluente costituito per esempio dall'usuale HCl diluito non verrà trattenuto a causa delle cariche dei due ioni H^+ e Cl^- . Specie analoghe contenute in un campione saranno completamente escluse dalla colonna ed usciranno in corrispondenza del cosiddetto volume di esclusione, in testa. D'altra parte molecole neutre possono diffondere senza ostacolo dentro e fuori della fase stazionaria. Il tempo di ritenzione dell'acqua presa come sostanza di riferimento di sostanza indissociata è fissato dal volume di permeazione totale. Quando un acido carbossilico, per esempio l'acido acetico, è iniettato nel sistema le sue molecole sono più o meno dissociate a seconda del pH dell'eluente. Le molecole indissociate anche in questo caso non sono affette da esclusione di Donnan e possono quindi essere trattenute. Sebbene l'acido acetico possa interagire con la fase stazionaria analogamente all'acqua, esso mostra un tempo di ritenzione molto più elevato. Questo può essere spiegato in termini di adsorbimento delle molecole di acido acetico sulla superficie della resina. Conseguentemente il processo di separazione di acidi carbossilici coinvolge sia il fenomeno di esclusione di Donnan sia effetti di adsorbimento. Inoltre più lunga è la catena alifatica dell'acido più lungo è il tempo di ritenzione. L'aggiunta di un modificatore organico all'eluente (per esempio acetonitrile) può ridurre i tempi di ritenzione bloccando i siti attivi di adsorbimento. Per quanto riguarda la rivelazione, usualmente vengono impiegati rivelatori conduttimetrici previa soppressione della conducibilità che può essere effettuata con un soppressore chimico dedicato costituito da una membrana cationica che può essere rigenerata e può essere impiegata sia nella cromatografia di esclusione sia nella cromatografia a coppia ionica. La membrana è costituita da un derivato polimerico polietilenico solfonato resistente ai solventi organici. La soluzione rigenerante può essere costituita da una base di alchil ammonio

quaternario come il tetrabutyl ammonio idrossido (TBAOH). Nel suo stato rigenerato la membrana è nella forma di tetrabutyl ammonio. Via via che la reazione di soppressione procede l'ione H⁺ dell'eluente viene scambiato con l'ammonio quaternario. A causa della molto minore conducibilità equivalente di quest'ultimo i corrispondenti sali hanno una conducibilità più bassa (G(TBACl)=100; G(HCl)=425 con G=conducibilità relativa). L'H⁺ viene poi neutralizzato dall'OH della soluzione rigenerante per dare il prodotto di soppressione H₂O. Eluenti alternativi all'HCl sono l'acido ottansolfonico (OSA) e l'acido tridecafluoroeptanico (TDF) che conferiscono alla soluzione una conducibilità più bassa a causa della minore conducibilità equivalente dei loro anioni (G(TBA OSA)=40; G(TBA TDF)=30).

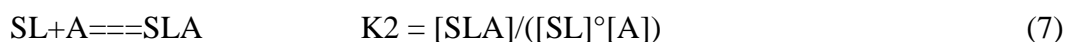
Sulla base della classica cromatografia a fase inversa, nei primi anni '80, si è sviluppata la Mobile Phase Ion Chromatography (MPIC). Essa combina una colonna da fase inversa ed un eluente in grado di dare coppie ioniche con un rivelatore a conducibilità soppressa. Questa tecnica ha dato un importante contributo per la determinazione di sostanze idrofiliche ioniche come i tensioattivi a molti complessi metallici. La fase stazionaria usata per le colonne da MPIC è una resina apolare stirene/divinilbenzene macroporosa. I fenomeni chimico fisici su cui è basato questo tipo di separazione non sono ancora perfettamente chiari.

Una prima ipotesi interpretativa propone la formazione di una coppia ionica neutra che è in grado di ripartirsi per adsorbimento con la fase stazionaria apolare.

Secondo questo modello l'ione analita A interagisce con l'ione lipofilo L dando origine al complesso AL che può interagire reversibilmente con la fase stazionaria apolare S nella forma ALS. Gli equilibri coinvolti sono:

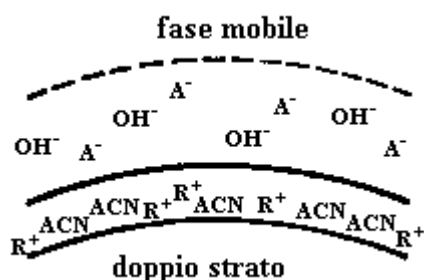


Una seconda ipotesi, d'altro canto, propone che l'ione lipofilo si "pianti" nella fase stazionaria lasciando fuori la sua porzione carica. In questo modo la fase stazionaria diventa una fase ionica che può discriminare i vari controioni nella fase mobile. In questo caso gli equilibri principali sono:



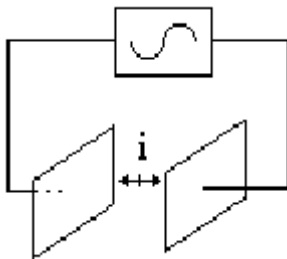
Una terza e più recente teoria basata su misure di conducibilità, che sembrano escludere la possibilità di formazione di coppie ioniche nell'eluente, afferma che a causa del carattere non polare della fase stazionaria e polare della fase mobile deve esistere una elevata tensione superficiale tra le due fasi. Questo fa sì che la fase stazionaria abbia affinità con sostanze che diminuiscono la tensione superficiale come solventi organici, tensioattivi o loro controioni oppure sali di ammonio quaternari. In questo modo si viene a creare un doppio strato elettrico all'interfase. La figura spiega schematicamente il concetto nel caso della eluizione di anioni non tensioattivi.

Nella regione interna gli ioni lipofili R, che sono stati aggiunti alla fase mobile, (per esempio ioni tetrabutyl ammonio) ed un modificatore organico (acetonitrile) ACN sono adsorbiti sulla superficie non polare.



A causa delle forze repulsive, solo una piccola frazione della fase stazionaria è occupata da questi cationi. I corrispondenti controioni, che sono gli ioni OH⁻ e gli A⁻ analiti, formano una regione diffusa circostante. Se la concentrazione di ioni lipofilici nell'eluente è aumentata essa aumenterà anche nella fase stazionaria data la natura dinamica degli equilibri in gioco. La selettività del sistema deriva dal fatto che la densità di carica della regione esterna dipende dal grado di idratazione dei controioni così ioni con basse entalpie di idratazione come lo ione I⁻ avranno una densità di carica superiore rispetto a ioni con alta entalpia di idratazione come lo ione OH⁻. Come risultato di questo fatto la densità di carica degli ioni lipofilici sulla superficie della resina può essere variata dall'interazione con i controioni a questo porta ad una variazione della tensione superficiale. La conseguenza di questi processi è che ioni con bassa entalpia di idratazione avranno tempi di ritenzione più lunghi. Nel caso della determinazione di ioni tensioattivi, essi possono penetrare la regione interna ed adsorbirsi sulla superficie della resina. Per questa classe di sostanze il tempo di ritenzione dipende dalla lunghezza della catena idrocarbonica e quindi dalla loro idrofobicità relativa comportando un tempo di ritenzione tanto più alto quanto più alta è questa caratteristica. L'aggiunta di modificatori organici come l'acetonitrile comporta una diminuzione dei siti attivi di adsorbimento e quindi, in ogni caso, una diminuzione dei tempi di ritenzione. Come già accennato in precedenza per la soppressione della conducibilità del fondo può essere usata una membrana scambiatrice cationica che in questo caso avrà come rigenerante una soluzione di acido solforico in quanto il tetralchilammonio idrossido è aggiunto alla soluzione eluente come ione lipofilico. Si avrà quindi uno scambio ionico che porta in soluzione ioni H⁺ che neutralizzano gli OH⁻ mentre il tetralchilammonio passa nel flusso della soluzione rigenerante e scaricato. Nonostante l'acqua non sia affetta da esclusione di Donnan l'acido acetico e gli altri acidi carbossilici hanno tempi di ritenzione maggiori a causa di fenomeni di adsorbimento, inoltre conta anche l'esclusione sterica. In questo caso dato che l'eluente classico è l'acido cloridrico si può fare una soppressione con cloruro di argento oppure con TBA Cl o TBA OH.

MISURE DI CONDUCEBILITA'



Sia dato uno ione i posto tra due elettrodi affacciati identici di superficie S e posti ad una distanza l . Sia applicato un campo elettrico, ε , alternato. La velocità di migrazione dello ione sottoposto a tale campo è

$$v_i = \varepsilon \cdot u_i$$

con

$$u_i = \frac{F}{6\pi\eta r}$$

mobilità ionica, η = viscosità, r = raggio dello ione, F = faraday. Il flusso dello ione i esimo e quello totale dono dati rispettivamente da

$$J_i = v_i \cdot N_i \cdot q_i$$

$$J = \sum J_i = \sum v_i \cdot N_i \cdot q_i = \varepsilon \sum u_i \cdot N_i \cdot q_i$$

con N = numero di molecole per unità di volume e q = carica dello ione. Dalle leggi di Ohm si ha

$$R = \rho \frac{l}{S}$$

$$R = \frac{V}{I}$$

con ρ = resistività ed I = corrente

$$\rho \frac{l}{S} = \frac{V}{I}$$

Dato che I/S rappresenta un flusso e V/l è un campo elettrico si ha

$$\rho = \frac{S V}{I l} = \frac{\varepsilon}{J}$$

da cui si può ricavare la conduttività

$$\kappa = \frac{1}{\rho} = \frac{J}{\varepsilon} = \sum u_i N_i |q_i|$$

$$\kappa = \sum u_i c_i \mathcal{N} |q_i| = \sum u_i \frac{c_i}{1000} F z_i$$

$$\kappa = \frac{F}{1000} \sum u_i c_i z_i$$

con \mathcal{N} = numero di Avogadro. Per una coppia di ioni

$$\kappa = \frac{F}{1000} (u^+ c^+ z^+ + u^- c^- z^-)$$

Per $c^+ z^+ = c^- z^- = C$ (normalità)

$$\kappa = \frac{FC}{1000} (u^+ + u^-)$$

$$\Lambda = \frac{\kappa 1000}{C} = F(u^+ + u^-) = \lambda^+ + \lambda^- \quad (\text{legge di migrazione indipendente degli ioni: Kohlrausch, 1876})$$

λ varia con la temperatura secondo la

$$\lambda_0^T = \lambda_0^{25} e^k (T - 25)$$

$k = 0.02$ a 25° . Da questa equazione si vede che si ha un aumento del 2% per ogni grado centigrado.

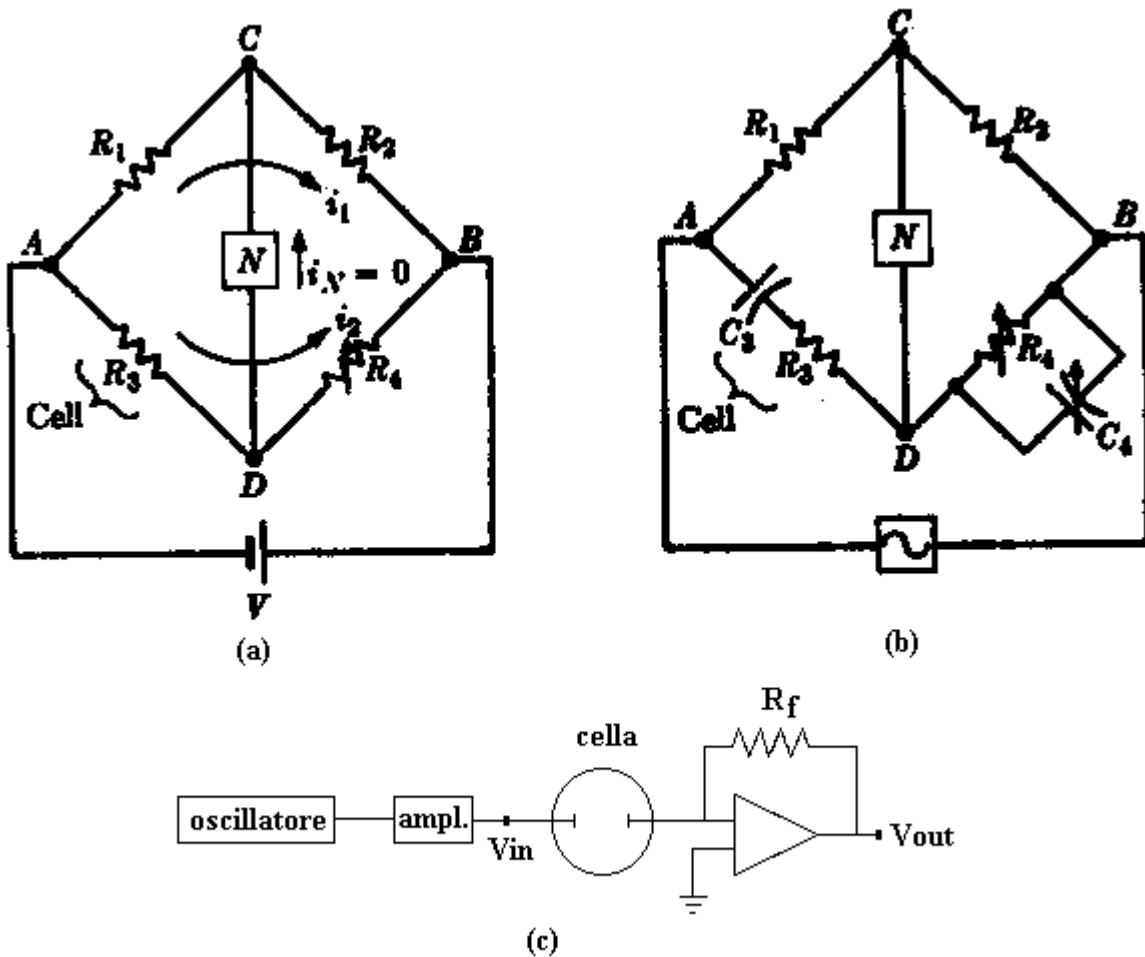
Ad alte C vale

$$\Lambda = \Lambda_0 - (a + b\Lambda_0)\sqrt{C} + eC \ln C + jC$$

a rappresenta l'effetto elettroforetico ed è funzione della temperatura, della pressione, della viscosità della soluzione e della costante dielettrica del solvente mentre b è l'effetto di rilassamento.

$$G = \frac{1}{R} = \frac{\Lambda C}{\kappa 1000}$$

La misura della conducibilità di una soluzione si effettua di solito con un ponte Weathspstone (a) in corrente alternata o ponte di Kohlrausch (b) oppure con il sistema elettronico riportato in fig. (c):



Nel caso del ponte di Kohlrausch la conducibilità si determina trovando la resistenza R_3 conoscendo R_1, R_2 ed R_4 dalla relazione:

$$R_1/R_2 = R_3/R_4$$

Nel caso della figura (c) la tensione in uscita, V_{out} , è data da

$$V_{out} = -i_{cella} R_f = \frac{V_{in} R_f}{R_{cella}}$$

Vediamo ora cosa succede quando, con una cella a conducibilità si vuole monitorare un cromatogramma. Quando un campione contenente una serie di anioni S- (vale lo stesso per i cationi) ed un catione comune è iniettato gli anioni sono fissati nella colonna ed una quantità equivalente di anioni della fase mobile E- è spostata in soluzione. I cationi e gli anioni risultanti dalla iniezione del campione (S+ E-) passano come un tappo lungo la colonna ed il rivelatore non trattiene. Dopo che questo tappo è passato l'eluente ripristina la linea di base. L'anione del campione comunque si muove in colonna per azione di massa. La concentrazione anionica totale in soluzione è fissata dalla concentrazione dell'eluente poiché un anione del soluto può passare in soluzione solo se se ne fissa uno dell'eluente. In cromatografia ionica, quindi, il principio di elettroneutralità e di equivalenza di scambio ionico si realizza nel fatto che il numero totale di equivalenti di cationi a di anioni è lo stesso. La conducibilità di fondo è data da:

$$G_f = \frac{(\lambda^{E+} + \lambda^{E-}) C_E}{\kappa 1000}$$

Durante l'eluizione di un anione monovalente S- con un eluente E la conducibilità dell'eluente è:

$$G_S = \frac{(\lambda^{S-} - \lambda^{E-}) C_S + (\lambda^{E+} + \lambda^{E-}) C_E}{\kappa 1000}$$

$$G_S = \frac{\lambda^{S-} C_S - \lambda^{E-} C_S + \lambda^{E+} C_E + \lambda^{E-} C_E}{\kappa 1000}$$

$$G_S = \frac{\lambda^{S-} C_S + \lambda^{E-} (C_E - C_S) + \lambda^{E+} C_E}{\kappa 1000}$$

questo è vero in quanto la variazione di conducibilità quando una banda di soluto passa attraverso il rivelatore risulta dalla sostituzione di alcuni degli anioni del campione con quelli dell'eluente sebbene la concentrazione totale rimanga la stessa:

$C_S + C_E = C_{tot}$ dove C_S è la concentrazione dell'anione del soluto a C_E è quella dell'anione eluente. Per una rivelazione con soppressione dell'eluente costituito da HCO_3^- in prima approssimazione si ha, dalla costante di dissociazione acida dell'acido carbonico: $[H^+] = [HCO_3^-] = \sqrt{K_a C}$. Dato che in generale:

$$G_f = \frac{(\lambda^{E+} + \lambda^{E-}) C_E \alpha}{\kappa 1000}$$

si ottiene

$$G_f = \frac{\lambda^{H^+} \sqrt{K_a C} + \lambda^{HCO_3^-} \sqrt{K_a C}}{\kappa 1000}$$

e per il campione S si ha

$$G_s = \frac{\lambda^{H^+} \sqrt{Ka(C - C_s)} + \lambda^{H^+} C_s + \lambda^{HCO_3^-} \sqrt{Ka(C - C_s)} + \lambda^{S^-} C_s}{\kappa 1000}$$

Il segnale netto è la differenza tra quello del segnale e quello del fondo, $\Delta G = G_s - G_f$ quindi

$$\Delta G = \frac{\lambda^{H^+} \sqrt{Ka(C - C_s)} + \lambda^{H^+} C_s + \lambda^{HCO_3^-} \sqrt{Ka(C - C_s)} - \lambda^{H^+} \sqrt{KaC} - \lambda^{HCO_3^-} \sqrt{KaC} + \lambda^{S^-} C_s}{\kappa 1000}$$

$$\Delta G = \frac{\lambda^{H^+} (\sqrt{Ka(C - C_s)} + C_s - \sqrt{KaC}) + \lambda^{HCO_3^-} (\sqrt{Ka(C - C_s)} - \sqrt{KaC}) + \lambda^{S^-} C_s}{\kappa 1000}$$

Se $C_s \ll C$ allora

$$\Delta G = \frac{(\lambda^{H^+} + \lambda^{S^-}) C_s \alpha}{\kappa 1000}$$

La linearità della risposta è valida solo fintantoché è valida quest'ultima relazione.

RIVELATORI PER HPLC ED HPIC

Rivelatore spettrofotometrico (di solito nel campo UV-VIS)

A filtri: si ha la massima energia passante, va bene per analisi di tracce ma è poco versatile.

A monocromatore (scelta continua di lunghezze d'onda) tra 200 e 800 nm.

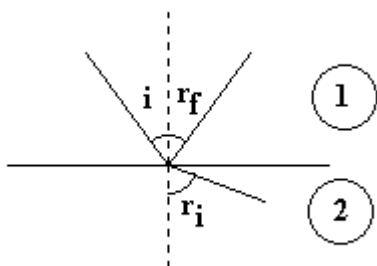
Ad array di diodi (scelta continua delle lunghezze d'onda): un array di 512 o 1024 diodi può registrare l'intero spettro ogni centesimo di secondo o meno durante l'eluizione. Con questa modalità si ha quindi una doppia risoluzione, quella cromatografica e quella spettroscopica.

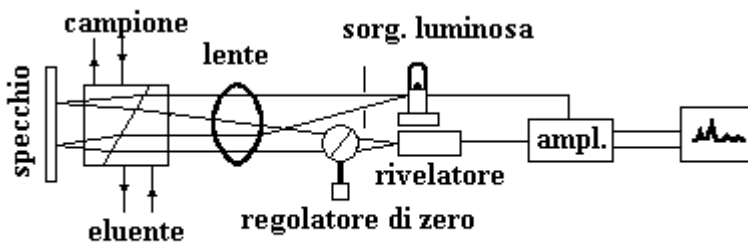
La cella ha normalmente un volume morto di 1-10 μ l ed ha una forma a Z con un cammino ottico di 1 cm.

Rivelatore a indice di rifrazione.

La presenza dell'eluato modifica l'indice di rifrazione della fase mobile

$$\frac{\text{sen } i}{\text{sen } r_i} = \frac{n_2}{n_1}$$





Schema di un rifrattometro a differenziale (a deflessione)

Sono rivelatori universali ma sono molto sensibili alla temperatura che deve essere controllata al millesimo di grado. Sono comunque poco sensibili e non permettono una eluizione a gradiente. La loro geometria può essere a deflessione o di Fresnell (figura).

Rivelatore a fluorescenza

L'eccitazione dell'eluato è effettuata con radiazione UV. Le sostanze possono essere naturalmente fluorescenti o possono essere rese tali (cloruro di dansile: 5 dimetilammino naftalen-1-solfonil cloruro).

Rivelatore amperometrico

Può essere coulombmetrico, amperometrico o amperometrico pulsato...

Rivelatore a conducibilità

Con soppressione e senza

Rivelatore a luce diffusa in evaporazione (ELSD).

L'eluato passa attraverso un nebulizzatore dove viene trasformato in aerosol molto fine da un flusso di azoto o aria. Le goccioline vengono portate in un tubicino dove avviene l'evaporazione del solvente e la formazione di particelle molto piccole di soluto che diffondono la luce proveniente da un fascio laser. La radiazione diffusa viene rivelata da un fotodiiodo al silicio. E' universale per i soluti altobollenti e più sensibile di un RI.

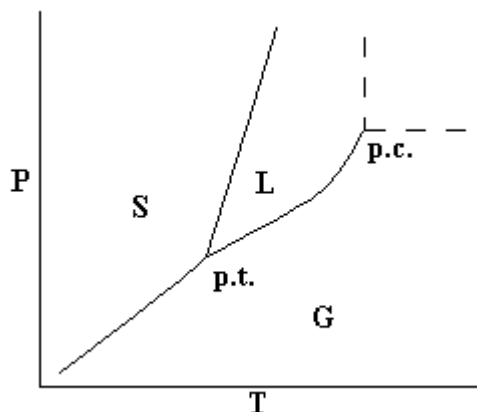
Rivelatore a massa

Rivelatore a FT-IR

CROMATOGRAFIA CON FLUIDO SUPERCRITICO (SFC).

Un fluido supercritico è un fluido che si trova al di sopra della sua P e T critica. In questo caso non si può dire nulla sul suo stato di aggregazione. Le proprietà fisiche, densità, viscosità, diffusività sono intermedie tra quelle dei liquidi e dei gas.

Gli eluenti più comunemente usati in SFC sono CO₂ (P_c = 72.8 atm, T_c = 31°C) ed n-pentano (P_c = 33.3 atm, T_c = 166.5°C).



Le condizioni operative sono analoghe a quelle dell'HPLC con due varianti:

- _ serve un forno termostatico
- _ serve un riduttore di pressione al termine della colonna

Un aumento di P provoca un aumento di densità ed un aumento del potere solvatante per specie ad elevato P.M.. In questo caso si può fare un gradiente di pressione al posto di quello di temperatura.

All'aumentare della P diminuisce k' e cioè diminuisce tr.

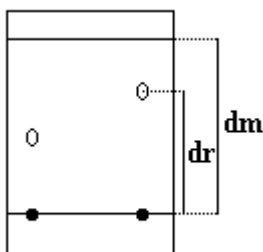
Le colonne possono essere impaccate a fase legata impaccate o capillari.

I rivelatori possono essere FID, Spettrofotometrici, a fluorescenza, ecc..

Gli analiti di interesse sono di solito sostanze labili termicamente e ad alto P.M..

CROMATOGRAFIA SU STRATO SOTTILE

La teoria è praticamente identica alla cromatografia su colonna. Lastre da 5X10 cm di media con strati di fase dai 100 ai 250 µm. Particelle da 5 a 20 µm. Il campione si carica come una macchia a 1-2 cm dal bordo della lastra e viene eluito con un opportuno eluente. La rivelazione degli analiti è effettuata spruzzando prodotti come iodio o acido solforico (adatti per sostanze organiche) o ninidrina o incorporazione di sostanze fluorescenti.



Il fattore di ritardo, R_f, è dato da

$$R_f = \frac{d_r}{d_m}$$

con d_r distanza percorsa dalla macchia e d_m distanza percorsa dal solvente. Per quanto riguarda il fattore di capacità:

$$k' = \frac{t_r - t_m}{t_m}$$

ed essendo $t=L/u$

$$k' = \frac{\frac{L}{u_r} - \frac{L}{u_m}}{\frac{L}{u_m}} = \left(\frac{1}{u_r} - \frac{1}{u_m} \right) u_m = \frac{u_m}{u_r} - 1 = \frac{u_m - u_r}{u_r}$$

$$k' = \frac{d_m - d_r}{d_r}$$

Le applicazioni della cromatografia su strato sottile sono: analisi qualitativa (per confronto con sostanze pure), analisi quantitativa (per confronto delle dimensioni della macchia con un composto standard).

ELETTROFORESI

Prevede la migrazione di specie cariche in un campo elettrico (5000 V applicati). La separazione avviene poiché ogni specie ha una propria mobilità ionica diversa dalle altre.

La fase stazionaria può essere costituita da un gel di silice depositato su vetro impregnato di un elettrolita di supporto per impedire moti convettivi.

Controindicazioni possono essere:

- una migrazione tortuosa
- l'adsorbimento superficiale
- difficile smaltimento di grandi quantità di calore
- formazione di gradienti termici dal centro alla periferia della lastrina con formazione di profili ad arco.
- Difficile automatizzazione.

METODI PER LA PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

1_ ESTRAZIONE CON SOLVENTI

2_ CONGELAMENTO

Separazione del solvente allo stato solido Adatto a Tutti i tipi di campione. Perdite per occlusione.

3_ LIOFILIZZAZIONE

Il campione viene congelato ed il solvente è rimosso per sublimazione sotto vuoto. Adatto a composti organici non volatili e ad inorganici e per volumi elevati. Tempi relativamente lunghi.

4_ OSMOSI INVERSA

L'acqua è rimossa per passaggio forzato attraverso membrane. Adatta per pesi molecolari superiori a 200.

5_ ULTRAFILTRAZIONE

L'acqua è filtrata attraverso membrane a porosità definita. Adatta per pesi molecolari elevati (>1000).

6_ STRIPPING

Un gas inerte, fatto gorgogliare nel campione, trascina i componenti volatili: "purge and trap" e spazio di testa.

7_ ESTRAZIONE ACCELERATA CON SOLVENTE (ASE)

si basa sui principi dell'estrazione con solvente tradizionale, ma utilizzando i solventi in condizioni sub-critiche, cioè ad elevate pressioni (1500-2000 psi) e temperature (100-150°C). L'alta temperatura aumenta la velocità di reazione e l'alta pressione innalza il punto di ebollizione del solvente; l'efficienza di estrazione in tal modo migliora ed è possibile non solo abbreviare il tempo di estrazione, ma anche ridurre le quantità di solvente necessario;

8_ ESTRAZIONE IN FASE SUPERCRITICA (SFE)

Si basa sui principi dell'estrazione solido/liquido tradizionale, ma utilizzando un fluido supercritico, cioè una sostanza al di sopra della sua temperatura e pressione critiche, le cui caratteristiche solventi sono superiori. I fluidi supercritici diffondono nei solidi con le medesime proprietà dei gas, ma portano in soluzione gli analiti come i liquidi, cosicché ne risulta aumentata la velocità di estrazione.

9_ MICRODIALISI

E' un processo di separazione con membrane semipermeabili che sfruttano la differenza di concentrazione degli analiti, tra soluzioni del campione e di dialisi, per farli passare in quest'ultima, concentrandoli a separandoli dalla matrice.

10_ ESTRAZIONE E MICROESTRAZIONE IN FASE SOLIDA (SPE, SPME)

Comporta significativi miglioramenti rispetto all'estrazione liquido/liquido tradizionale, poiché permette la contemporanea eliminazione degli interferenti e la concentrazione degli analiti. La soluzione del campione è fatta eluire attraverso un letto di adsorbimento, di silice modificata o polimero funzionalizzato, su cui si concentrano gli analiti, mentre le altre componenti del campione non vengono trattenute.

L'estrazione avviene in quattro fasi, (1) condizionamento dei gruppi funzionali, (2) ritenzione degli analiti, (3) rimozione delle specie indesiderate e (4) eluizione degli analiti di interesse. Diretta emanazione della SFE è poi la microestrazione in fase solida (SPME) che utilizza una microfibra di silice fusa ricoperta con una fase stazionaria polimerica. La fibra è immersa nel campione e gli analiti, soprattutto organici, sono adsorbiti su di essa e possono essere trasferiti in adatta soluzione per la successiva analisi.

11_ FOTOLISI UV

Sfrutta l'energia della radiazione ultravioletta per ossidare e degradare le molecole organiche, al fine di annullarne il potere chelante e quindi l'interferenza nella determinazione degli analiti. La digestione del campione non è basata sull'interazione diretta della radiazione ultravioletta con le molecole organiche, bensì sulla formazione di radicali, generati fotoliticamente dalla decomposizione dell'acqua o mediante aggiunta di H_2O_2 ($\text{HO}\cdot$) o di HNO_3 ($\text{NO}\cdot$), che reagiscono con i composti organici, degradandoli.

12_ DIGESTIONE CON IRRAGGIAMENTO TRAMITE MICROONDE

Si basa sulle proprietà di trasferimento di energia delle microonde per solubilizzare il campione in presenza di reattivi, senza però dover raggiungere le elevate temperature proprie della normale digestione acida ed inoltre riducendo drasticamente quantità di reagenti necessari e tempi di attacco del campione.

13_ PIROIDROLISI

Si basa su un'interazione della matrice con corrente di vapore, senza aggiunta di reattivi, che porta all'estrazione degli acidi volatili che vengono poi determinati nel condensato.

OTTIMIZZAZIONE DI UN CROMATOGRAMMA

Dalle informazioni derivanti dall'equazione della risoluzione si vede che servono ulteriori informazioni sulla forma a la separazione dei picchi per l'ottimizzazione di un intero cromatogramma. Un'idea sulla separazione dei picchi si può ottenere dalle tre equazioni seguenti che esprimono l'entità della separazione tra due picchi sulla base della profondità dell'avvallamento tra di essi.

La prima è la funzione di separazione di picco di Kaiser espressa da

$$P = f/g$$

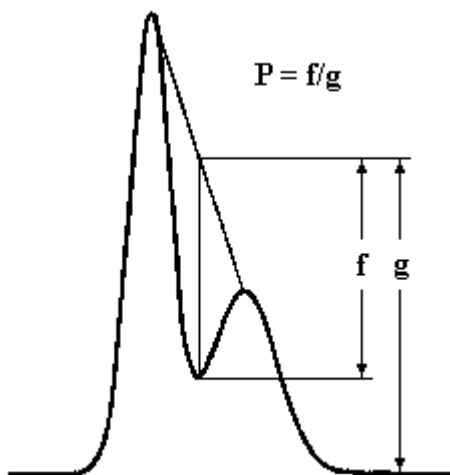


FIGURA 12

dove g è l'altezza del punto di incrocio del segmento che unisce i massimi dei picchi con la linea sale verticale dall'avvallamento tra i due picchi ed f è la profondità dell'avvallamento relativa allo stesso punto. Quando $P=1$ si ha una separazione alla linea di base.

Il secondo criterio è stato suggerito da Schupp ed è il rapporto medio picco-valle espresso da

$$P_m = f_m/g_m$$

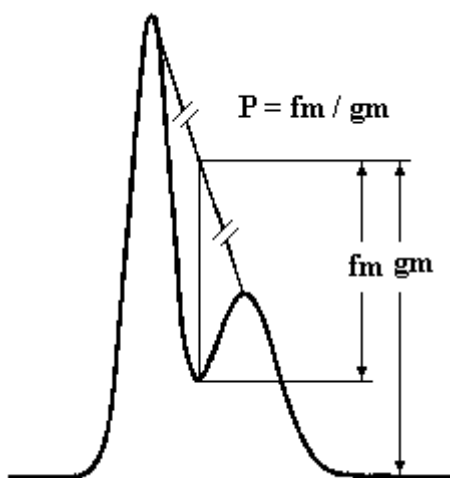


FIGURA 13

dove g_m è l'altezza misurata come prima ma rispetto alla media delle altezze dei picchi. Anche f_m ha l'analogo significato.

Il terzo criterio, introdotto da Christophe, è il rapporto valle cima espresso da

$$P_{v,i}=1-v/h_i$$

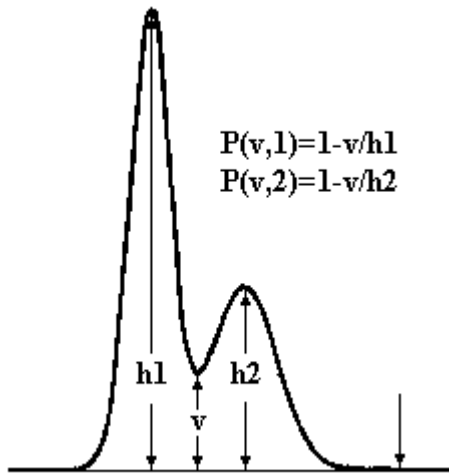


FIGURA 14

Questo criterio misura la profondità dell'avvallamento rispetto alle altezze di entrambi i picchi. In questo caso quindi si potrà avere una indicazione per ogni picco anziché per una coppia. Per picchi gaussiani di uguale altezza, comunque, i tre criteri descritti forniscono esattamente lo stesso risultato. Tre caratteristiche importanti di questi parametri sono:

P può essere facilmente stimato dal cromatogramma;

In teoria P varia con l'altezza dei due picchi: da dati simulati variano poco P e Pm ma varia molto Pv; A causa della sua definizione P tiene conto delle asimmetrie dei picchi a quindi può essere applicato a picchi di qualsiasi forma .

Per picchi gaussiani di uguale altezza P può essere espresso in termini di R mettendo in relazione f, g e v con i parametri che descrivono un picco gaussiano h e σ .

$$A(t) = h_A \exp\{-0.5[(t-t_A)/\sigma_A]^2\}$$

$$B(t) = h_B \exp\{-0.5[(t-t_B)/\sigma_B]^2\}$$

Sostituendo $t = 1/2(t_A+t_B)$ che è il tempo di ritenzione dell'avvallamento e considerando $\sigma_A=\sigma_B$ si ha

$$v = g - f = h_A e^{-\frac{1}{2}\left(\frac{0.5(t_A+t_B)-t_A}{\sigma}\right)^2} + h_B e^{-\frac{1}{2}\left(\frac{0.5(t_A+t_B)-t_B}{\sigma}\right)^2}$$

$$v = g - f = h_A e^{-\frac{1}{2}\left(\frac{t_B-t_A}{2\sigma}\right)^2} + h_B e^{-\frac{1}{2}\left(\frac{t_B-t_A}{2\sigma}\right)^2}$$

$$v = g - f = h_A e^{-2R^2} + h_B e^{-2R^2}$$

Dato che i tempi di ritenzione sono simili si può scrivere:

$$v = g - f \approx (h_A + h_B) e^{-2R^2}$$

$$P = f/g = (g-v)/g$$

$$g = (h_A + h_B)/2$$

$$P = \frac{\frac{(h_A + h_B)}{2} - (h_A + h_B)e^{-2R^2}}{\frac{(h_A + h_B)}{2}}$$

$$P = 1 - 2e^{-2R^2}$$

Quando $P=0$ allora $\exp[-2R^2]=1/2$ da cui si ricava $R=0.58871$. Questo è il valore minimo di soglia al di sotto del quale non si ha variazione di P ma solo di R . Un criterio ovvio con cui valutare la separazione tra dei picchi cromatografici è quello di quantificare l'area del picco libera da sovrapposizione. L'equazione è

$$FO = (A_n - A_{n,n-1} - A_{n,n+1}) / A_n$$

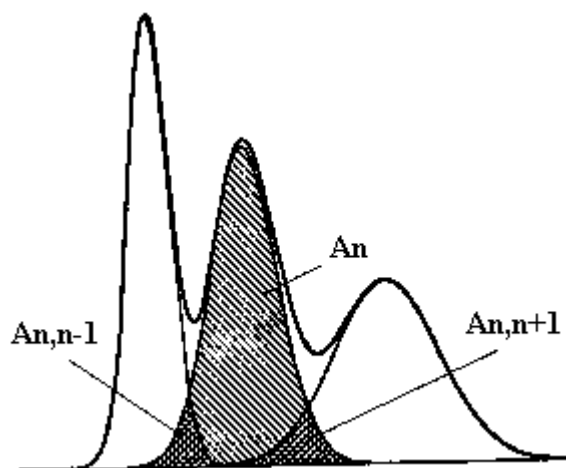


FIGURA 15

dove A_n è l'area dell'ennesimo picco, $A_{n,n-1}$ è l'area che esso condivide con il precedente a $A_{n,n+1}$ è quella che condivide con il successivo. La FO dà buone informazioni sulla accuratezza con cui è determinato un picco quantitativamente ma non si deve confondere con l'errore in un'analisi quantitativa che è invece dipendente, oltre che dalla separazione, anche dagli algoritmi, eventualmente di deconvoluzione, utilizzati per la determinazione delle aree dei picchi.

Fattore di separazione

Il fattore di separazione è definito come la risoluzione a meno del termine di efficienza che di norma è fissato dalla colonna ed è un parametro poco variabile. Si definisce quindi:

$$S = \frac{k'_B - k'_A}{k'_B + k'_A + 2} = \frac{t_B - t_A}{t_B + t_A}$$

Questa grandezza ha il vantaggio che può essere ottenuta più facilmente della risoluzione dal cromatogramma infatti non serve stimare la larghezza del picco a non serve avere il tempo morto.

Vantaggi:

- S è direttamente legata alla teoria cromatografica come R ;
- S può essere facilmente ricavata dal cromatogramma;
- non è richiesta la stima di t_0 .

Svantaggi:

l'uso di S implica picchi gaussiani;

il numero di piatti teorici è assunto costante in tutto il cromatogramma (cioè N indipendente da k').

Per quest'ultimo inconveniente si può scrivere:

$$S = \frac{k'_B - k'_A}{k'_B + k'_A + 2} f(k')$$

Ottimizzazione di un cromatogramma

Per l'ottimizzazione di un cromatogramma la scelta più semplice è quella di considerare solo le coppie con peggior separazione e tralasciare le altre ma spesso capita che nel tentativo di migliorarne alcune se ne peggiorano altre (eluizione inversa). Un primo criterio prevede l'ottimizzazione di tutte le coppie definendo

$$RX_s = \sum_i RX_{i+1,1}$$

RX può essere R, P, S. Le considerazioni che possono essere fatte su questa equazione sono:

il suo valore è determinato essenzialmente dalla risoluzione della coppia più trattenuta e quindi non va bene per descrivere un cromatogramma. È evidente che questo comporta dei tempi troppo lunghi e quindi è necessario porre dei vincoli come per esempio imporre che se $RX > 1.5$ si smetta l'ottimizzazione;

dà una migliore rappresentazione della separazione attuale di una data colonna dato che c'è un limite al contributo dell'ampiezza di una coppia di picchi;

oltre un certo numero di piatti la sommatoria non varia più mentre varia molto il tempo di ritenzione.

sotto un certo numero di piatti la sommatoria è nulla e quindi, ancora, non dà più informazioni sul cromatogramma;

i valori della somma e in colonne con diversa efficienza possono essere facilmente predette dato che la prima è proporzionale alla \sqrt{N} e la seconda è indipendente. Per quanto riguarda la sommatoria di P nulla si può dire.

Questo tipo di approccio non dà in definitiva molte informazioni sul cromatogramma.

La seconda categoria di criteri per descrivere un intero cromatogramma è quella del "prodotto di risoluzione"

$$RX_s = \prod_i RX_{i+1,1} = e^{\sum_i \ln RX_{i+1,1}}$$

In questo caso lo scopo è quello di separare i picchi nel cromatogramma in modo regolare dato che la più piccola R ha l'effetto dominante. Inoltre, se solo una delle R è 0 tutto il prodotto si azzerava. Il criterio del prodotto è molto più delicato della somma per questi motivi.

Per superare questo inconveniente si ricorre al prodotto di risoluzione normalizzato

$$r = \prod_{i=1}^{n-1} \frac{R_{i,i+1}}{R_m} = e^{\sum_i \ln \frac{R_{i,i+1}}{R_m}}$$

con n=numero dei picchi e con la risoluzione media definita come

$$R_m = \frac{1}{n-1} \sum_i R_{i+1,1}$$

Un inconveniente è che non tiene conto di dove si colloca il primo picco per cui un ulteriore miglioramento è dato dall'introduzione del "picco immaginario" con il quale si definisce il prodotto di risoluzione normalizzato calibrato:

$$r^* = \prod_{i=0}^{n-1} \frac{R_{i,i+1}}{R_m} = e^{\sum_i \ln R_{i,i+1}}$$

con n=numero dei picchi e con la risoluzione media definita come

$$R_m = \frac{1}{n} \sum_i R_{i+1,1}$$

In questo caso vale

$$R_{1,0} = \frac{t_1 - t_0}{t_1 + t_0} \frac{\sqrt{N}}{2}$$

Questo provoca una spaziatura in tempi brevi ma non dà indicazione su dove andrà a finire l'ultimo picco. Per tenere conto del tempo bisogna aggiungere un secondo termine. Il problema di trovare un criterio rigoroso di descrizione multipla è estremamente complesso ma può essere semplificato introducendo un termine additivo che sia in relazione con il tempo. Definiamo quindi una "funzione cromatografica di risposta" come:

$$CRF = \sum_i \ln \frac{P_i}{P_0} + D(t_m - t_n)$$

con P_i e P_0 funzioni di separazione di Kaiser attuale a desiderata; t_m e t_0 i tempi desiderato e dell'ultimo picco, D fattore di peso.

Analoga a questa è la "funzione di ottimizzazione cromatografica":

$$COF = \sum_i \ln \frac{R_i}{R_0} + b(t_m - t_n)$$

PROCEDURE DI OTTIMIZZAZIONE

Dopo aver scelto i parametri da ottimizzare si devono definire i loro domini di esistenza a poi valutarli con vari metodi. Questi metodi possono essere suddivisi in due categorie:

sequenziali
simultanei

La prima classe prevede di arrivare all'ottimo sequenzialmente (SIMPLEX), mentre la seconda prevede di condurre un numero adeguato di esperimenti variando in ognuno dei parametri a lasciandone fissi degli altri in modo da giungere simultaneamente al risultato. Tutto questo diventa estremamente importante in una eluizione a gradiente.