



UN ANNIVERSARIO DA NON DIMENTICARE

La strumentazione per gascromatografia festeggia i suoi primi cinquant'anni.
Un excursus storico su una tecnica separativa, ineguagliabile
dal punto di vista sia quantitativo che qualitativo.

si sessant'anni che vanno dalla fine della seconda guerra mondiale ai giorni nostri saranno senza dubbio ricordati come gli anni d'oro della strumentazione analitica. È in questo periodo che si sono sviluppate e affermate praticamente tutte le tecniche analitiche strumentali che oggi utilizziamo, anche se, in molti casi, le basi teoriche erano già state poste negli anni precedenti. In ordine "quasi" cronologico e senza la presunzione di volerle citare tutte, ricordiamo: spettrometria di massa inorganica e successivamente organica, spettrofotometria UV-Vis, spettrofotometria IR, gascromatografia, spettrofotometria di assorbimento atomico, analisi termica e calorimetria differenziale DSC, microanalisi CHN-O-S, HPLC, spettrometria ICP, tecniche combinate, quali GC-MS, LC-MS, GC-FTIR, TGA-FTIR. Per

completare il quadro citiamo le tecniche di biologia molecolare: amplificatori di DNA (thermal cycler), sintetizzatori di DNA e di proteine, lettori di micropiastre, sistemi per liquid handling, spettrometri di massa per le biotecnologie. È senza dubbio un poderoso complesso di apparecchiature che hanno permesso alla chimica, nel senso più ampio del termine, di progredire in modo sempre più rapido e hanno fornito i mezzi per creare e supportare quello che oggi definiamo controllo ambientale. A questo punto qualcuno potrebbe chiedersi: ma, quando non esisteva questa strumentazione, come si facevano le analisi?

Semplicemente, la maggior parte di quelle possibili oggi

non si facevano o richiedevano lunghi procedimenti. Una caratteristica di quei tempi, da sottolineare, è che molte delle apparecchiature utilizzate erano in vetro: per il punto di fusione, per la determinazione di CHN, per la distillazione analitica, per la determinazione dell'idrogeno in miscele gassose, per analisi elettrochimiche ecc.

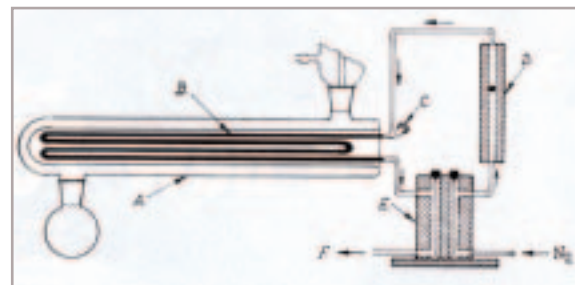


Fig. 1 - Gascromatografo in vetro costruito all'inizio degli anni '50:
a) camicia riscaldante a vapore, la temperatura viene variata cambiando il liquido nel palloncino; b) colonna cromatografica; c) iniettore con tappino tipo penicillina perforabile; d) rotametro; e) rivelatore a conducibilità termica



Fig. 2 - Un laboratorio della Esso con una batteria di mod. 154. I registratori erano in gran parte sotto i banchi (1956)

La gascromatografia

Anche i primi gascromatografi, costruiti dai pionieri in alcuni laboratori universitari e centri di ricerca, erano in vetro. Chi scrive ha avuto la ventura di lavorare per alcuni anni (dal 1956 al 1961) su uno strumento in

Modello 154 Vapor Fractometer della Perkin Elmer come "a splendid example of automatic analysis", anche se di "automatico", come lo intendiamo oggi, aveva ben poco. Non esistevano campionatori automatici né integratori per la misura dell'area dei picchi e l'operatore doveva essere pronto a variare l'attenuazione del registratore potenziometrico, se un picco tendeva ad andare fuori scala o se era troppo piccolo per poter essere misurato, altrimenti l'analisi era da rifare. Il concetto di automatico

di liquidi era veramente un esercizio per operatori "abili";

- gli articoli che trattavano di nuove applicazioni, che uscivano sulle riviste con un andamento esponenziale, riportavano spesso l'uso di fasi liquide originali, mai usate, difficili da identificare e quindi da reperire (un esempio per tutti, il tide, che solo dopo alcuni mesi identificammo come il nome commerciale di un detersivo, allora in vendita solo negli USA);

- la messa a punto di una nuova analisi era in pratica una ricerca, prima bibliografica, (senza gli ausili degli indici per tipo di composto e per fase liquida, sviluppati negli anni Sessanta), e poi un impegnativo lavoro sperimentale, per le difficoltà di scelta e di reperimento di fasi liquide "sicure", per decidere le condizioni di realizzazione

vetro realizzato dal gruppo di Taramasso, presso i Laboratori Studi e Ricerche dell'ENI di San Donato Milanese. Qualche giovane si chiederà: ma funzionavano?

Certamente e anche con risultati molto buoni... purchè usati da chi li aveva progettati. I primi gascromatografi commerciali vennero introdotti nel 1955 da alcune ditte di strumentazione (tra le quali si affermò la Perkin-Elmer Corp.). Questi strumenti, completamente in metallo, potevano essere usati da qualunque operatore (dotato di un minimo di attitudine all'uso della strumentazione) e, molto importante, fornivano buoni risultati già dalle prime analisi. Per garantire questa immediata applicabilità, la Perkin-Elmer in particolare offriva una ventina di colonne con le indicazioni delle loro più importanti applicazioni e i relativi cromatogrammi. Fu subito un grande successo. Uno dei più noti commentatori della già diffusa "Analytical Chemistry", Ralph Mueller, definiva il

era però giustificato dalla facilità operativa, dall'efficienza separativa e dalla capacità di ottenere agevolmente risultati quantitativi accurati. Inoltre, analisi che avrebbero richiesto diverse ore di lavoro si effettuavano in poche decine di minuti con una semplice introduzione di 20 microlitri di campione.

Una tecnica analitica o un'arte?

Vale la pena, per avere un quadro completo, fare un flash sulle condizioni in cui si operava:

- ovviamente non erano ancora nate le ditte fornitrici di materiali di riempimento e di colonne (alcuni produttori le fornivano per i propri strumenti non indicando, spesso, i dati completi sul materiale di riempimento, ma solo l'applicazione per la quale era consigliata);

- non esistevano le attuali microsiringhe, ma solo le siringhe comprate in farmacia e l'iniezione riproducibile di microquantità



Fig. 3 - Marcel Golay con le sue "creature" (le colonne capillari)

della colonna analitica (tipo di supporto, trattamento da far subire al supporto, percentuale di fase liquida, lunghezza della colonna) e finalmente le condizioni dell'analisi gascromatografica. Gli strumenti nei primi anni operavano solo a temperatura costante ed essendo equipaggiati con rivelatori a conducibilità termica, inseriti nella camera della colonna, dovevano essere "stabilizzati" per almeno due ore, ogni volta che si decideva di sperimentare l'analisi a una temperatura diversa.

Ma una buona separazione di tutti i componenti o la scoperta di prestazioni non



Fig. 4 - Un gascromatografo dell'inizio degli anni '60, collegato con uno spettrometro di massa RMU-6 Hitachi (il gascromatografo è l'unità appoggiata sul banco, sulla sinistra, con a fianco il registratore potenziometrico)

ancora note di una nuova, o già conosciuta, fase liquida, ripagavano ampiamente delle fatiche e delle inevitabili delusioni.

Una formidabile tecnica separativa, quantitativa e anche qualitativa

Nonostante queste difficoltà e limitazioni, il gascromatografo assicurava una velocità di analisi, una versatilità, una capacità separativa e soprattutto la possibilità di determinazioni quantitative semplici e accurate, tali da rendere obsolete, nel giro di pochi anni, tecniche di analisi ufficiali, quali la distillazione analitica nel settore petrolifero. Aggiungiamo che, ottimizzate le condizioni operative, la conduzione dell'analisi era abbastanza semplice ed era possibile, attraverso il tempo di ritenzione, avere indicazioni importanti per il riconoscimento dei composti incogniti.

Le prime applicazioni

L'analisi dei gas fu uno dei primi settori conquistati dalla gascromatografia e la Perkin Elmer sviluppò una valvola di campionamento per introdurre quantità perfettamente

riproducibili di gas, che divenne il prototipo di tutte quelle prodotte fino ai giorni nostri. L'industria petrolifera e la petrolchimica divennero in breve grandi utilizzatori di gas cromatografi e i banchi dei laboratori cominciarono a ospitare batterie di questi strumenti, ma anche molti altri settori andavano scoprendo le eccezionali possibilità di questa tecnica. Vennero svi-

luppate anche apparecchiature "da processo", gascromatografi predisposti per una specifica analisi, che venivano installati direttamente su determinati punti degli impianti.

L'evoluzione tecnologica e costruttiva

Il "Vapor Fractometer Model 154" Perkin Elmer nacque già con soluzioni costruttive tuttora applicate: camera delle colonne, riscaldata con circolazione forzata di aria; evaporatore del campione riscaldata indipendentemente; setto di iniezione in gomma; rivelatore a conducibilità termica prima a termistori (particolarmente sensibili per le analisi dei gas) e successivamente a filamenti per operare a temperature più elevate. Ma la tecnica si evolveva rapidamente. Ogni giorno si scoprivano nuove applicazioni e contemporaneamente i ricercatori e le ditte produttrici, che nel frattempo si erano moltiplicate anche in Europa e in Giappone, proponevano nuove soluzioni per migliorare la capacità operativa delle apparecchiature, disporre di rivelatori più sensibili e robusti,

ridurre i tempi morti e così via. Tra le molte idee e proposte di quegli anni, spiccano tre pietre miliari:

- le colonne capillari,
- il rivelatore a ionizzazione di fiamma,
- la programmazione di temperatura della colonna analitica.

Le colonne capillari

Partendo da considerazioni teoriche sui processi che erano alla base della separazione gascromatografica, Marcel J.E. Golay, uno dei più versatili scienziati della Perkin Elmer, sperimentò e brevettò, nel 1958, le colonne capillari. Queste colonne, lunghe fino a 100 m, erano costituite da un sottile tubetto (diametro esterno 1,6 mm e diametro interno di 0,25 o 0,50 mm) rivestito internamente da una delle fasi liquide normalmente impiegate per le colonne standard e disponevano di un'efficienza separativa fino a 100 volte superiore a quella di una normale colonna "impaccata". Costruite all'inizio in acciaio inossidabile (e in vetro dai singoli ricercatori) vennero utilizzate soprattutto nel settore petrolifero e in quello degli oli essenziali; solo alla fine degli anni Settanta, con l'introduzione delle capillari in silice fusa e grazie al progresso della strumentazione, raggiunsero la diffusione molto ampia che oggi conosciamo.

Il rivelatore a ionizzazione di fiamma

Fra i vari rivelatori inventati e sperimentati, diversi dal rivelatore a conducibilità termica che dominò la scena nei primi anni, si affermò quello a ionizzazione di fiamma. Dotato



Fig. 5 - Il mod. 900, presentato nel 1967. Poteva montare fino a quattro rivelatori contemporaneamente (la parte destra dello strumento accoglie i cassettei modulari con l'elettronica di controllo dei rivelatori). Alcuni di questi strumenti hanno lavorato per oltre 25 anni



Fig. 6 - Serie Sigma. Presentata nel 1977, comprendeva quattro modelli di gascromatografi e un'unità (sulla destra) di acquisizione, calcolo, registrazione e controllo di più unità cromatografiche. Un vero e proprio calcolatore dedicato alla gascromatografia

di sensibilità elevata (da 100 a 1.000 volte quella della conducibilità termica), praticamente utilizzabile dopo pochi minuti dall'accensione dello strumento, insensibile alle variazioni di temperatura della colonna e del gas di trasporto, molto robusto, divenne presto il rivelatore di elezione (con l'unica limitazione di non "vedere" i gas inorganici). Era indispensabile per operare con le colonne capillari e dobbiamo alla sua sensibilità, che permise di iniettare quantità dell'ordine delle frazioni di microlitro, l'ulteriore espansione della gascromatografia all'analisi di sostanze altobollenti e non facilmente evaporabili, quali gli steroidi, gli idrocarburi policiclici, i trigliceridi degli acidi grassi ecc.

ricorrere a lunghe, e non sempre possibili, procedure di estrazione. Tra le applicazioni più importanti citiamo l'analisi dei residui di monomero nei polimeri, di tracce di solventi nei prodotti farmaceutici e l'impiego nel controllo ambientale per l'analisi di inquinanti organici volatili nelle acque e nei terreni. Vogliamo ricordare anche una delle prime applicazioni: l'analisi dell'alcol nel sangue, che portò il primo strumento Perkin Elmer, il mod. F40, nei laboratori della polizia di molti paesi del mondo e... sui libri gialli. "... Il piccolo contenitore in vetro che conteneva il sangue di Tom si avvicinava lentamente al punto dove l'ago avrebbe perforato il tappino in gomma e trasferito i

modo univoco, con il semplice dato del tempo di ritenzione. La spettrometria di massa si presentava, già nei primi anni Sessanta, come la tecnica ideale per questa identificazione, effettuata sia raccogliendo il componente ignoto all'uscita della colonna, mediante la cosiddetta gascromatografia preparativa e sottoponendolo quindi all'analisi di massa, sia collegando direttamente lo spettrometro al gascromatografo. E ciò era possibile grazie all'elevata velocità di analisi, alla sensibilità più che adeguata e alla capacità dello spettrometro di accettare piccoli flussi di gas di trasporto. La gascromatografia preparativa consisteva nell'iniettare

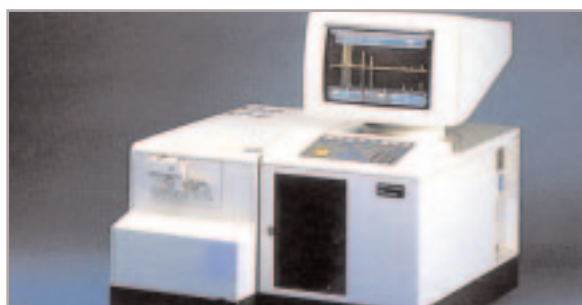


Fig. 7 - Continua l'evoluzione dell'informatica. La Serie 8000 poteva incorporare un processore per il controllo strumentale e con tutte le funzioni di elaborazione del cromatogramma, che appariva in tempo reale sullo schermo a colori (1983)



Fig. 8 - La "scatola" sulla destra del PC è lo spettrometro di massa a quadrupolo. Dedicato esclusivamente all'identificazione e alla rivelazione ad alta sensibilità dei componenti separati dal gascromatografo, si diffonde ampiamente grazie al costo contenuto e alla grande facilità operativa

la massima quantità possibile di campione nella colonna (eventualmente di diametro maggiore), cercando di mantenere sempre una separazione accettabile del

La programmazione di temperatura della colonna

Anche questa fu un'importante evoluzione introdotta alla fine degli anni Cinquanta. Aumentando la temperatura della colonna durante l'analisi, in modo riproducibile e in funzione dei punti di ebollizione delle sostanze contenute nel campione, fu possibile ottimizzare la separazione, ridurre i tempi di analisi ed estendere ulteriormente l'applicabilità della gascromatografia a campioni con un ampio intervallo di punti di ebollizione.

L'analisi gascromatografica automatica dello spazio di testa

L'invenzione della tecnica della head space chromatography si fa risalire al prof. Machata dell'università di Vienna. La Perkin Elmer presentò nel 1967 il primo strumento di questo tipo. In pratica si risolveva il problema dell'analisi diretta di prodotti volatili contenuti in matrici non evaporabili, senza

vapori nel gascromatografo. Tutti gli occhi erano puntati sul pennino del registratore, che avrebbe dato la risposta... L'autore di quel giallo aveva veramente visto in funzione l'F40. Anche i più moderni strumenti Perkin Elmer per l'analisi dello spazio di testa sono basati sul principio originale, brevettato, del bilanciamento di pressione, che permette di operare senza l'uso di siringhe di aspirazione. Recentemente è stata sviluppata HS-Trap, per realizzare una pre-concentrazione automatica del campione da analizzare, con un sostanziale miglioramento dei limiti di rivelabilità.

L'identificazione del campione e l'accoppiamento con la spettrometria di massa

Il punto debole della gascromatografia è sempre stata la sicura identificazione dei composti ignoti che separati dalla colonna non potevano essere identificati in

composto da identificare, che veniva quindi raccolto in un'opportuna "trappola" raffreddata, posta all'uscita del gascromatografo. Per una quindicina di anni sono stati anche prodotti apparecchi dedicati esclusivamente alla preparativa. Ovviamente la soluzione ideale era il collegamento diretto allo spettrometro e nel 1968 la Perkin Elmer presentava il mod. 270, il primo sistema integrato GC-MS, costituito da un gascromatografo mod. 900 e da uno spettrometro di massa, progettato per questa applicazione (le dimensioni erano contenute, poco più grande di una scrivania).

Nei decenni successivi sono stati fatti progressi enormi: le dimensioni dello spettrometro sono ora inferiori a quelle del gascromatografo, i costi si sono ridotti drasticamente e la GC-MS è diventata una tecnica di routine, grazie anche alla facilità operativa e all'immediata identificazio-

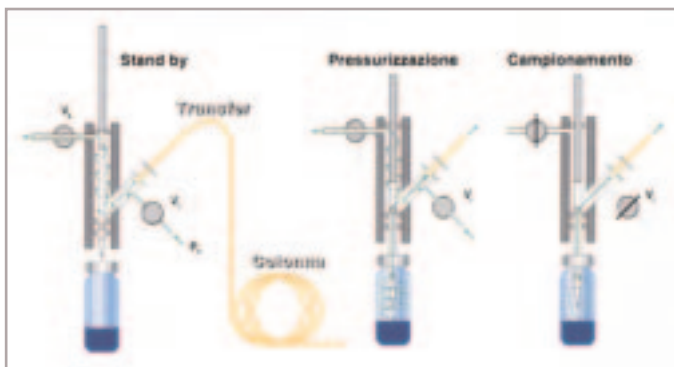


Fig. 9 - I tre stadi del sistema Perkin Elmer di analisi dello spazio di test: termostatazione, pressurizzazione e introduzione nel GC senza l'uso di siringhe o valvole di campionamento, per garantire l'integrità del campione

ne delle sostanze incognite, che viene effettuata dal PC di gestione dello strumento per confronto con raccolte di decine di migliaia di spettri memorizzati.

I sistemi di calcolo del cromatogramma

Fin dall'inizio si accertò che le aree dei picchi, che apparivano sul registratore, erano proporzionali alla quantità dei corrispondenti componenti iniettati. Il metodo più semplice e rapido per il calcolo di queste aree consisteva nell'assimilare il picco a un triangolo e tracciando le tangenti ai punti di flesso, poiché in effetti si trattava di una gaussiana, determinare una base, che moltiplicata per l'altezza e divisa per due, forniva un valore molto vicino all'area effettiva. Per fare una misura più accurata era però necessario misurare anche l'eventuale "coda". Venne quindi introdotto nei laboratori il planimetro, uno strumentino che richiedeva mano ferma, molta attenzione e altrettanta pazienza (fino al giorno prima era conosciuto solo dagli impiegati del catasto, che lo usavano per la misura dei terreni sulle mappe). Ma il metodo di calcolo che sicuramente oggi lascia più attoniti è il "taglio e pesata": i picchi del cromatogramma venivano accuratamente ritagliati e pesati (distruggendo tra l'altro il cromatogramma: non esistevano ancora le fotocopiatrici). Il vantaggio per i chimici più accurati (nel taglio) era un sicuro impiego negli atelier di moda. Già alla fine degli anni Cinquanta vennero introdotti i primi integratori automatici di aree, che nei

Otto generazioni di strumenti per gascromatografia

Dal 1955 a oggi si sono succedute almeno otto generazioni di gascromatografi. Nei primi decenni era soprattutto il progresso della tecnica gascromatografica, che richiedeva nuovi strumenti: la programmazione di temperatura, il rivelatore a ionizzazione di fiamma, le colonne capillari e l'esigenza di disporre di più rivelatori sullo strumento; vennero infatti introdotti i rivelatori selettivi, ECD, NPD, FPD e altri, particolarmente sensibili a determinati atomi presenti nel composto analizzato (cloro, azoto, fosforo ecc.).

A questi avanzamenti della tecnica cromatografica dobbiamo aggiungere i progressi dell'elettronica, l'introduzione del microprocessore e successivamente del computer, senza dimenticare tutta la tecnologia di controllo digitale della portata e della pressione dei vari gas che vengono usati, che si è resa disponibile negli anni più recenti.

Oggi il gascromatografo, come la maggior parte della strumentazione analitica, è completamente controllata dal computer e gli operatori possono lavorare tranquilli con un comfort e una sicurezza inimmaginabile per i pionieri di questa tecnica.

decenni successivi diventarono "elettronici" e poi veri e propri calcolatori dedicati alla cromatografia, con software molto sofisticati, che costituiscono la base dei moderni programmi di acquisizione ed elaborazione del cromatogramma per personal computer.

L'importanza della gascromatografia nella vita di ogni giorno

Come altre tecniche analitiche anche la gascromatografia ha avuto, e ha tuttora, importanti impieghi nel settore alimentare e nel controllo degli inquinanti organici di acqua, aria e suolo. L'elevata sensibilità e la risposta selettiva del rivelatore a cattura di elettroni permettono di tenere sotto controllo la concentrazione dei residui di antiparassitari, eventualmente presenti nella frutta e nella verdura che arriva sulle nostre tavole, come pure di evidenziare gli stessi prodotti nelle acque destinate all'agricoltura ed al consumo umano. L'olio di oliva ha goduto di una particolare attenzione già all'inizio degli anni Sessanta, quando è stata condotta un'indagine gascromatografica sistematica sulla produzione di diverse annate, per stabilire l'intervallo tipico di concentrazione dei vari acidi grassi in questo olio, ponendo le basi per stroncare l'adulterazione con oli di semi. E ancora, il controllo dei vini: tutti ricorderanno lo scandalo del vino "al metanolo". Una semplice analisi gascromatografica rileva immediatamente quantità anomale di questo alcol. Completiamo questa esemplificazione con il controllo degli inquinanti organici nell'aria che respiriamo, sia all'aperto, sia nelle case e negli uffici, in cui passiamo molte ore della nostra giornata. Speciali tubetti, riempiti di adsorbenti e "indossati" dalle singole persone permettono di raccogliere gli inquinanti ai quali siamo esposti e determinarne i corrispondenti livelli di concentrazione mediante gascromatografia. E l'elenco potrebbe continuare. Forse sarebbe il caso di ringraziare i tanti operatori, scienziati e tecnici che hanno contribuito, con passione e competenza, allo sviluppo e al progresso di questa formidabile tecnica analitica.



Fig. 10 - Una modernissima unità GC Clarus 500: sulla sinistra lo spettrometro di massa Turbomass e sulla destra l'unità automatica per l'analisi dello spazio di testa con HS Trap System