



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TERAMO

CL in BIOTECNOLOGIE

*Anno Accademico 2023/2024*

# CHIMICA ANALITICA

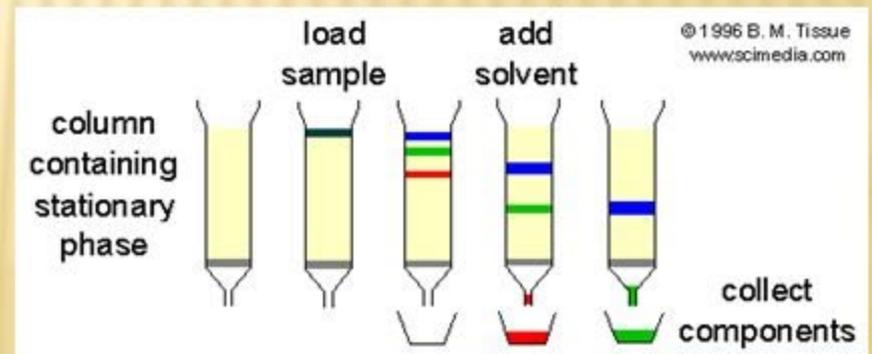
## Cromatografia

# LA CROMATOGRAFIA



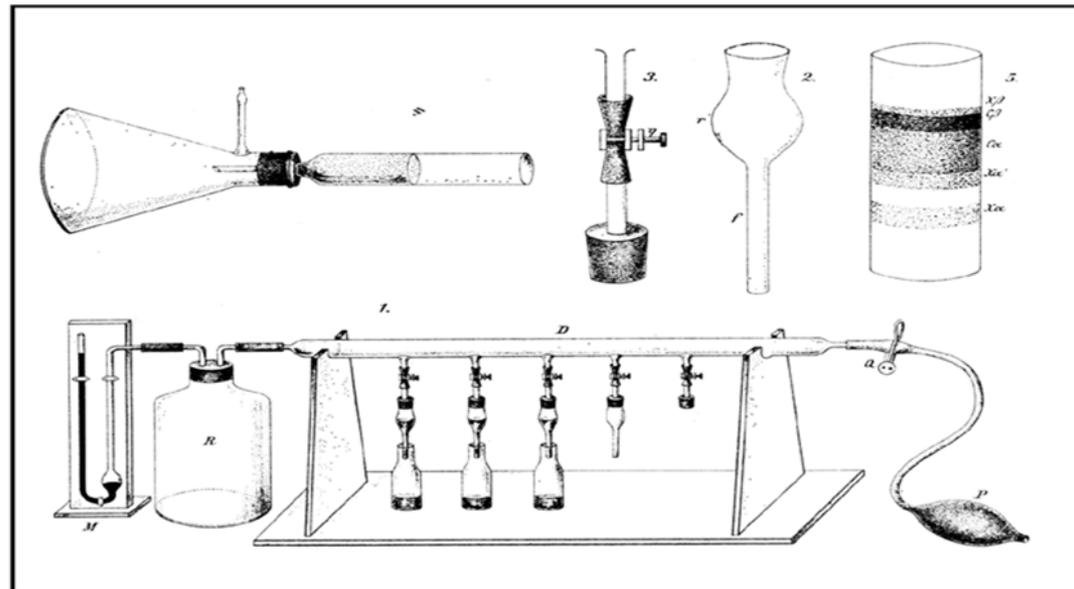
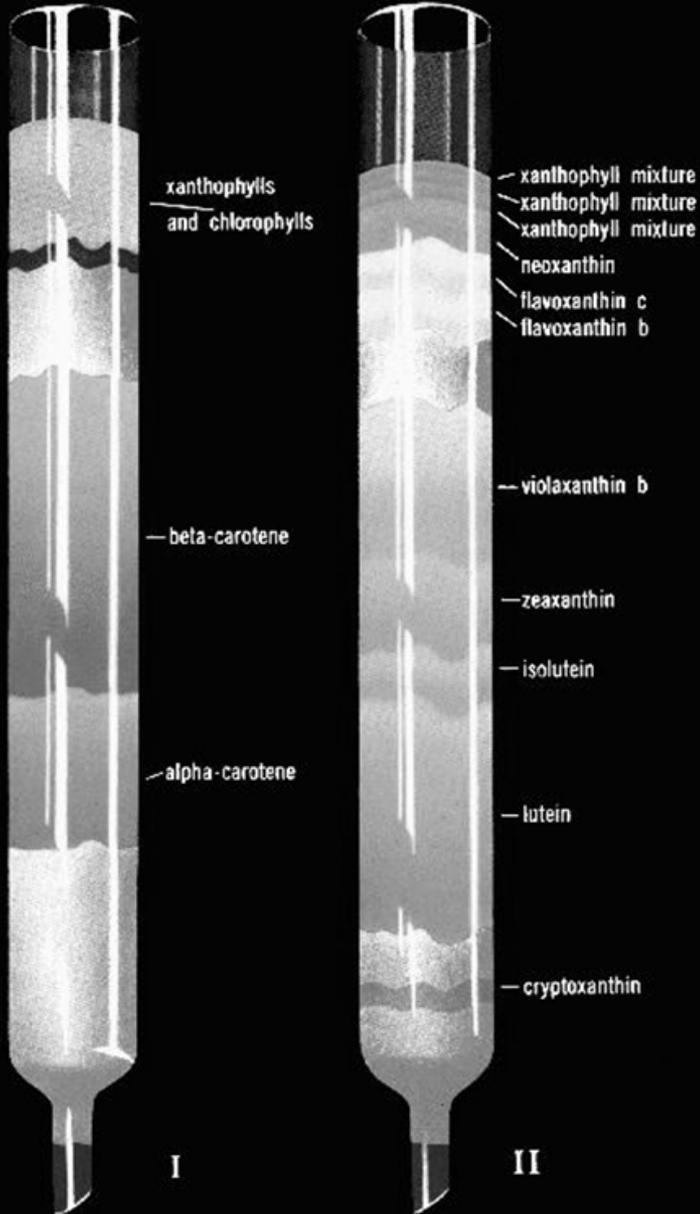
- ✦ Mikhail S. Tsvett, botanico russo, separò su di una colonna i pigmenti delle foglie verdi (1906);

✓ la separazione era visualizzata dalla comparsa di bande colorate, da cui il nome CROMATOGRAFIA che deriva infatti dal greco e significa “scrittura con il colore”



# Cromatografia

La nascita della cromatografia si deve al botanico russo Mikhail Semenovich Tsvett, che per primo la utilizzò nel 1906 per separare i pigmenti naturali contenuti in estratti vegetali.



# Cromatografia liquida: Dal 1906 ad oggi



La miscela di pigmenti,  
prima di aggiungere  
l'eluente



Dopo aver aggiunto l'eluente,  
i componenti della miscela si  
sono separati.



# Primi anni della cromatografia

UNITE

UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI TERAMO

1898-1903 **D. Trebot Day**, geologo americano, separò alcuni idrocarburi utilizzando colonne di farina fossile.

1903-1906 **M. Tswett**, botanico russo, separò una serie di pigmenti colorati presenti in un estratto di foglie verdi utilizzando  $\text{CaCO}_3$  ed etere di petrolio; coniò anche il nome cromatografia che significa "scrittura mediante il colore".

1930-1931 **R. Kuhn e E. Lederer** utilizzarono la cromatografia per la separazione di carotenoidi e xantofille.

1938 **N.A. Izmailov e M.S. Shaiber** descrissero per la prima volta la cromatografia su strato sottile

1941 **A.J.P. Martin e R.L.M. Syngé** presentarono il primo lavoro sulla cromatografia di ripartizione. Essi introdussero la teoria dei piatti basata su di un'analogia con la teoria della distillazione e dell'estrazione controcorrente.

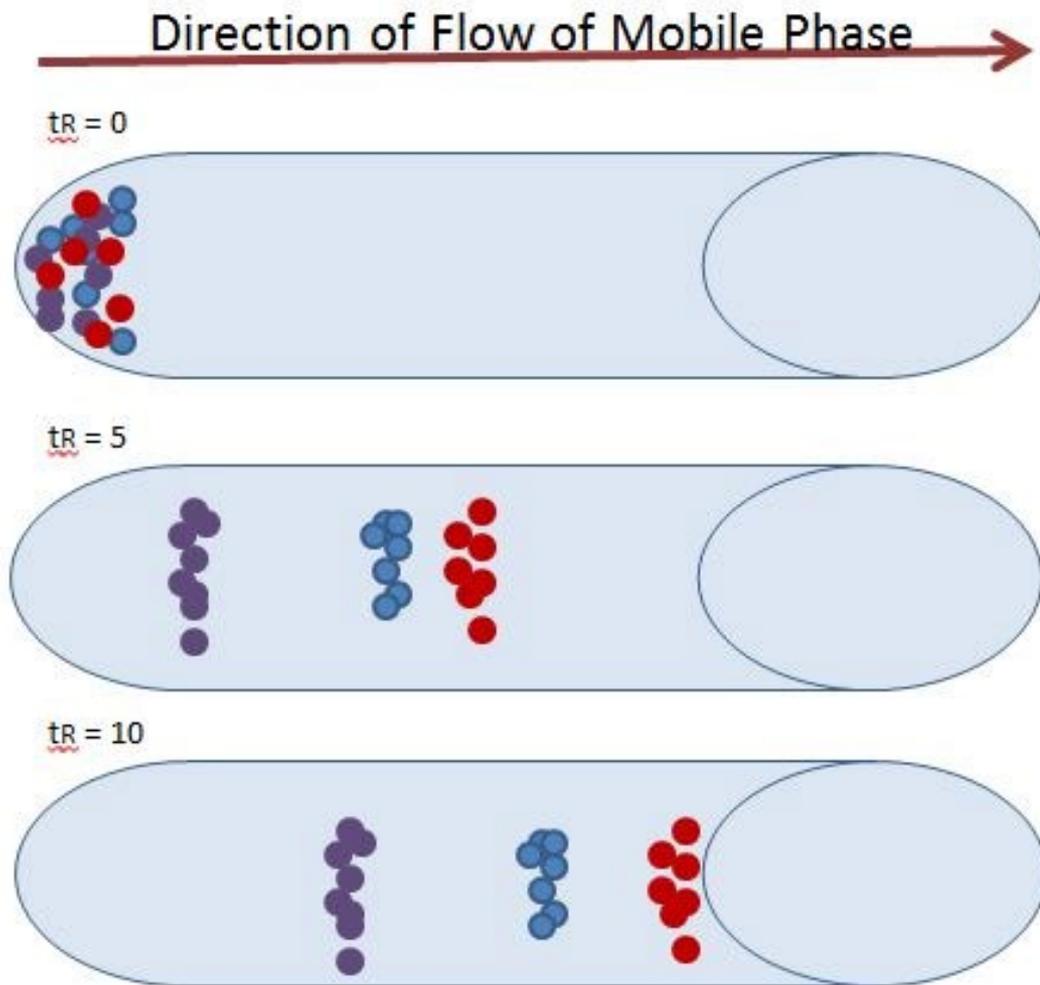
1952 **A.J.P. Martin e R.L.M. Syngé** ebbero il premio Nobel per la chimica per lo sviluppo della cromatografia di ripartizione. Nello stesso anno, in collaborazione con **A.T. James** realizza la cromatografia gas-liquido.

1956 **J.J. van Deemter** sviluppò la teoria della separazione cromatografica.

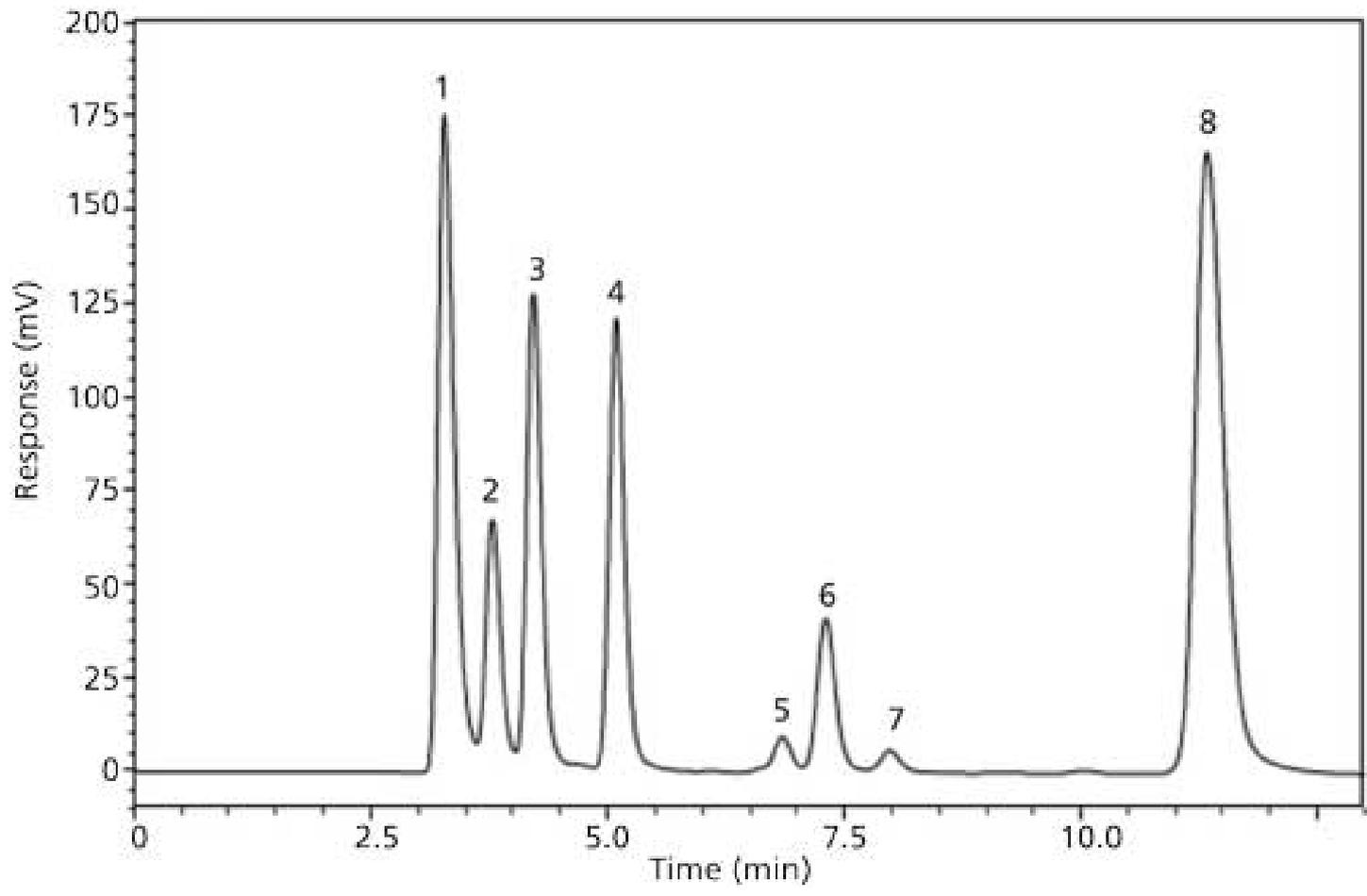
1958 **E. Stahl** mise a punto la tecnica della cromatografia su strato sottile.

1966 Inizia lo sviluppo della moderna tecnica della cromatografia in fase liquida ad alta prestazione.

INJECTOR



DETECTOR



## Descrizione generale della cromatografia

I metodi cromatografici sono accomunati dalla separazione di sostanze presenti in miscela attraverso l'uso di una **fase stazionaria** e di una **fase mobile**.

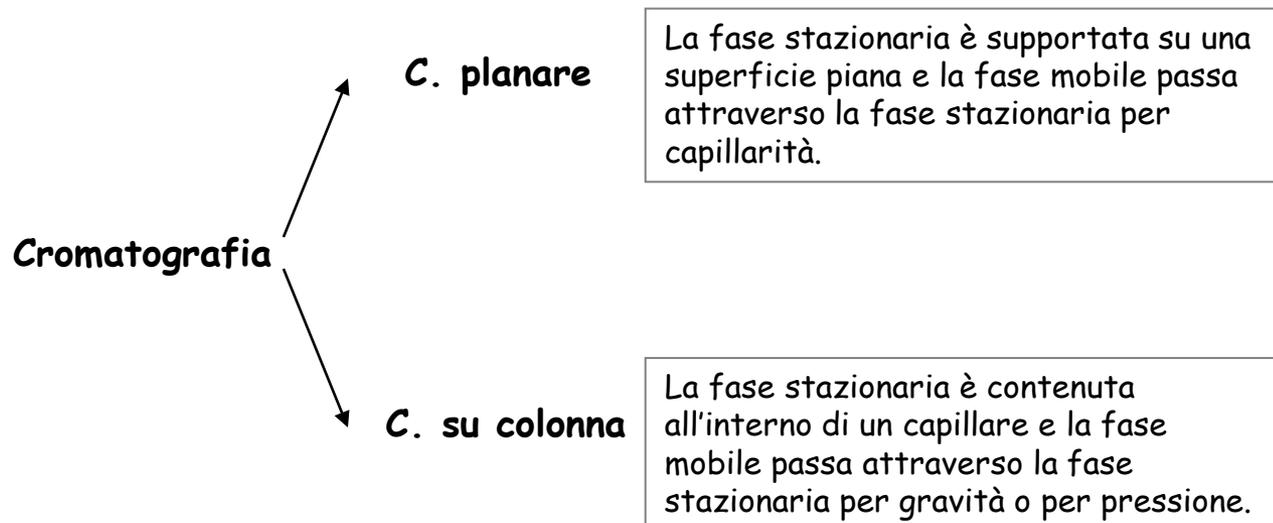
I componenti sono trasportati lungo la fase stazionaria dal flusso della fase mobile (**Eluizione**).

La diversa ripartizione tra queste due fasi determina la separazione dei componenti.

Fase stazionaria: fase fissa in una determinata posizione (o colonna o superficie planare)

Fase mobile: fase che si muove lungo, o attraverso la fase stazionaria, trasportando con sé l'analita

## Classificazione



# **TLC**

## ***Thin Layer Chromatography - Cromatografia su strato sottile***

E' una tecnica prevalentemente analitica separazione/purificazione di composti contenuti in una miscela e per la loro identificazione qualitativa e/o quantitativa.

### **TCL in Fase Diretta**

fase stazionaria polare (es. gel di silice)  
fasi mobili non polari per svolgere l'eluizione.

### **TLC in Fase Inversa**

fase stazionaria modificata chimicamente  
(oppure imbevuta con sostanze non polari)  
fase mobile relativamente polare

MECCANISMI DI ADSORBIMENTO

MECCANISMI DI RIPARTIZIONE.

## SUPPORTO

Vetro - Permette di visualizzare meglio le macchie dal dietro della lastra.

Plastica - Alcuni solventi organici possono intaccare tale tipo di lastra.

Alluminio - Tali lastre non possono essere usate in ambienti alcalini o acidi per acidi minerali.



Fase stazionaria (0.2 - 0.5 mm)

Supporto solido

Analitica: 250 $\mu$ m

Preparativa: 50-2000  $\mu$ m

# FASE STAZIONARIA

## **Fase stazionarie solide**

L'interazione (adsorbimento) di questi materiali con la fase mobile dipende dalla geometria delle particelle che le costituiscono.

L'attività: esprime la capacità di adsorbire le sostanze in termini quantitativi, ma più spesso è riferita semplicemente all'entità dell'adsorbimento.

## **Fase stazionarie liquide**

Impiegate nella cromatografia a fasi inverse.

sostegno inerte (lastrine di gel di silice G oppure Kieselguhr) rivestito di un liquido più o meno lipofilo (idrocarburi, oli e grassi vegetali, glicoli, siliconi...)

## Gel di silice

È costituito da acido silicico ( $\text{H}_4\text{SiO}_4$ ) amorfo altamente poroso ottenuto, sotto forma di particelle dure e leggermente opache, trattando il vetro solubile, silicato di sodio ( $2\text{Na}_2\text{O SiO}_2$ ), con acido solforico. Il gel ha una struttura amorfa simile a quella del vetro.

## Ossidi di alluminio o allumina

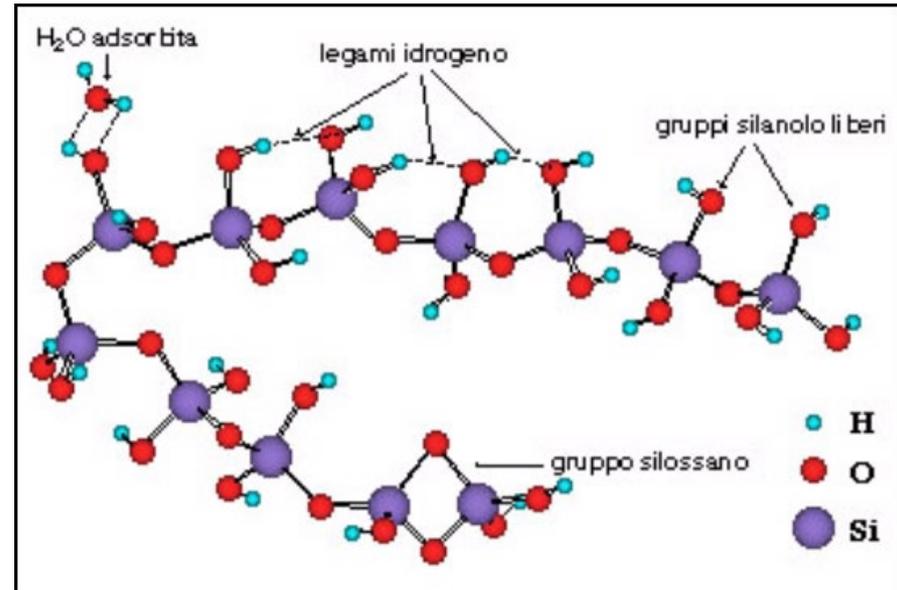
allumina di tipo basico l'attività dipende dalla quantità di acqua presente in esso;

## Cellulosa in polvere

evoluzione della cromatografia su carta tempi di esecuzione più brevi la preparazione di strati più omogenei minore diffusione delle macchie;

## Kieselguhr

acido silicico amorfo di origine fossile ( terra di diatomee);



# FASE MOBILE

La polarità è fondamentale per la scelta dell'eluente è da essa che dipende l'entità del trascinamento delle sostanze lungo la lastrina in una TLC potere eluente: capacità relativa dei

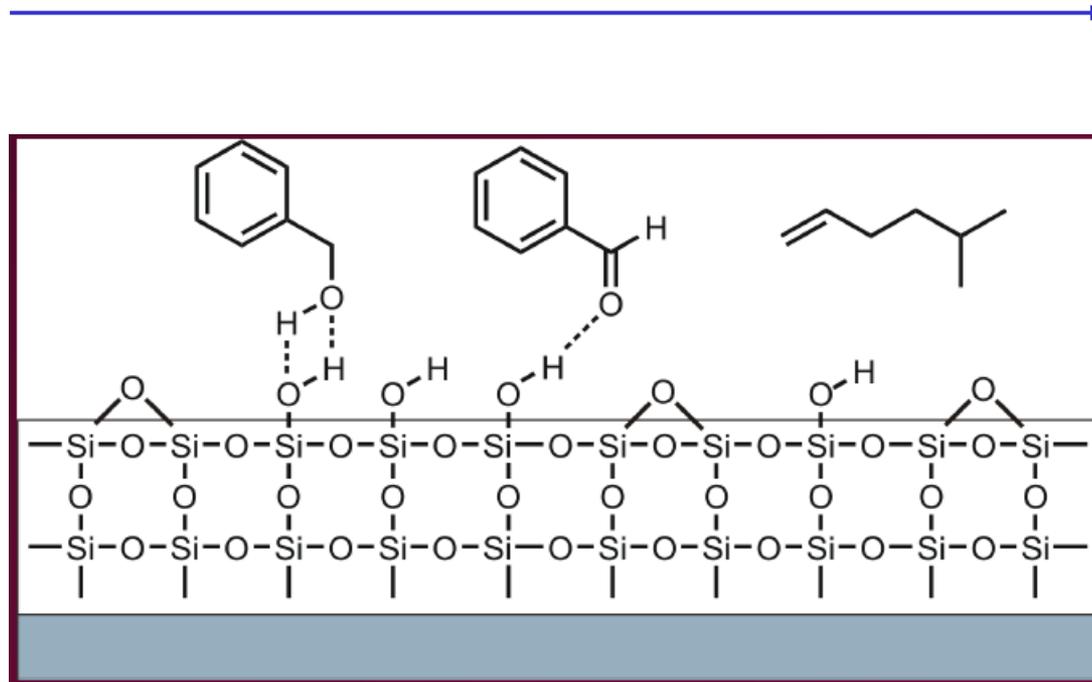
vari solventi di far muovere una sostanza su una fase stazionaria serie eluotropa: Il potere eluente dei più comuni solventi organici, puri ed in miscele, ordinato secondo polarità crescente



Miscele o solventi puri	composizione
Benzene	
Benzene/cloroformio	1+1
Cloroformio	
Cicloesano/acetato d' etile	8+2
Cloroformio/acetone	95+5
Benzene/acetone	9+1
Benzene/acetato d' etile	8+2
Cloroformio/dietilere	9+1
Benzene/metanolo	95+5
Benzene/dietilere	6+4
Cicloesano/acetato di etile	1+1
Cloroformio/dietilere	8+2
Benzene/acetone	8+2
Cloroformio/metanolo	99+1
Benzene/metanolo	9+1
Cloroformio/acetone	85+15
Benzene/dietilere	4+6
Benzene/acetato di etile	1+1
Cloroformio/dietilere	6+4
Cicloesano/acetato d' etile	2+8
Acetato di butile	
Cloroformio/metanolo	95+5
Cloroformio/acetone	7+3
Benzene/acetato di etile	3+7
Acetato di butile/metanolo	99+1

Quando la fase mobile sale lungo la silice, i composti in essa disciolti sono in grado di interagire con i gruppi polari della silice. Le interazioni in gioco sono principalmente **dipolo-dipolo** e formazione di **legami ad idrogeno** e dunque quanti più polari sono i composti, tanto più verranno trattenuti dalla fase stazionaria.

### Fase Mobile

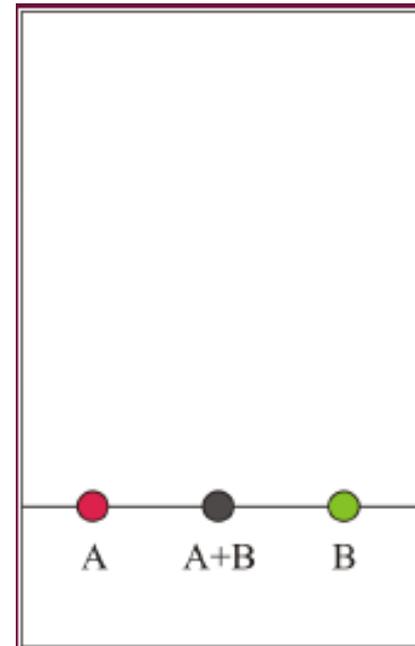
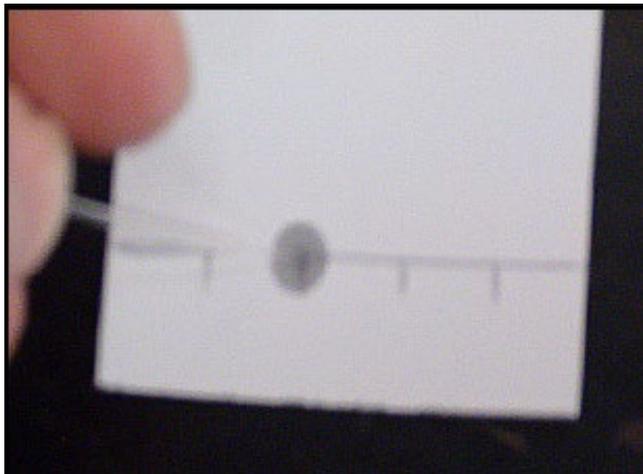


# Modalità operativa

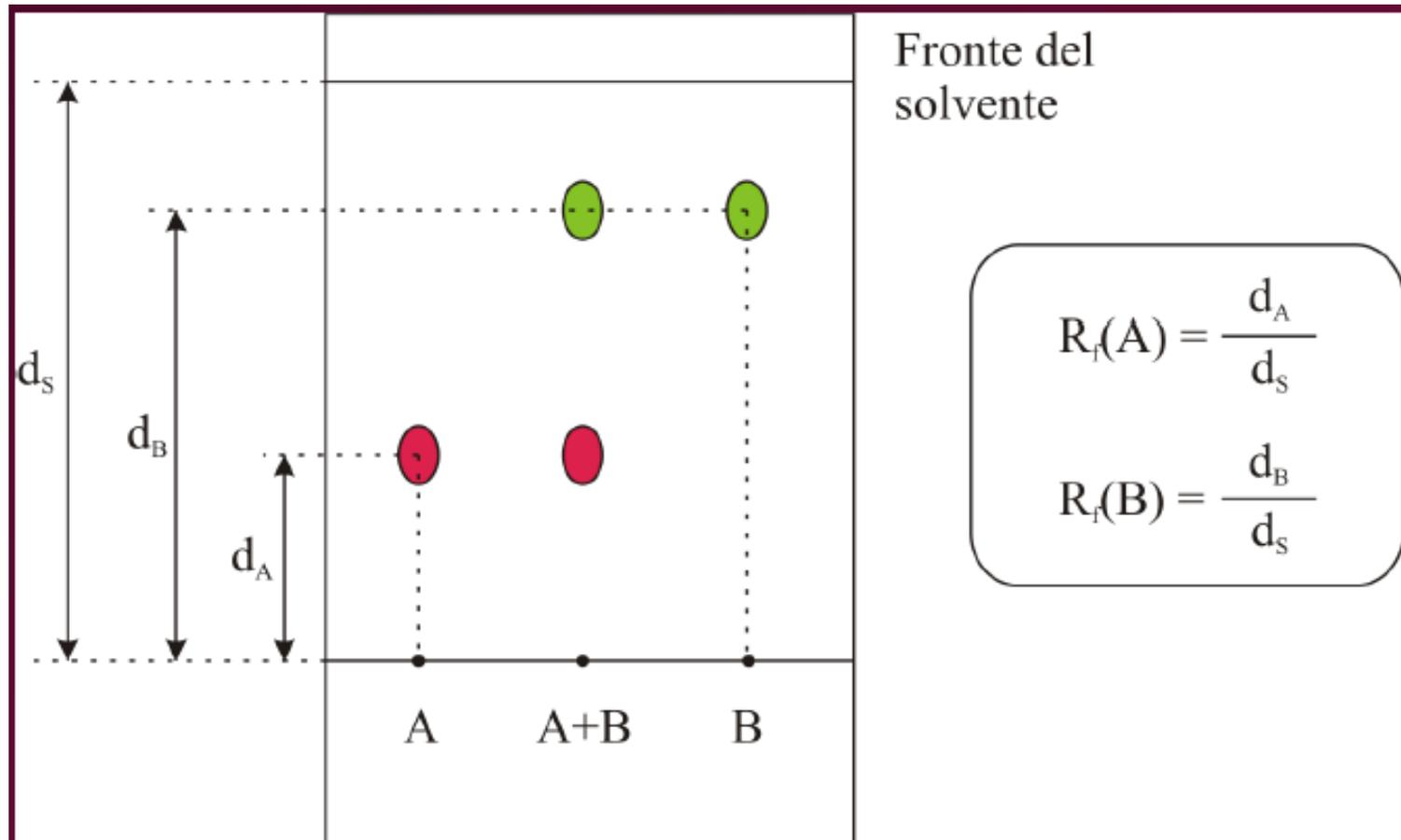
## Deposizione del campione

Il campione deve essere deposto alla base della lastrina, con l'aiuto di un capillare come macchia (deposizione a goccia) o come striscia (deposizione lineare), nel modo più compatto possibile.

Il campione deve essere deposto senza intaccare lo strato di fase stazionaria. Se il campione è molto diluito, occorre depositare il campione più volte e perciò è utile asciugare la macchia con un phon in modo da evitare un allargamento eccessivo.



Una volta individuate tutte le macchie di sostanza, esse possono essere caratterizzate dal **fattore di ritardo ( $R_f$ )**, che esprime l'affinità relativa della sostanza per il sistema fase mobile/fase stazionaria:

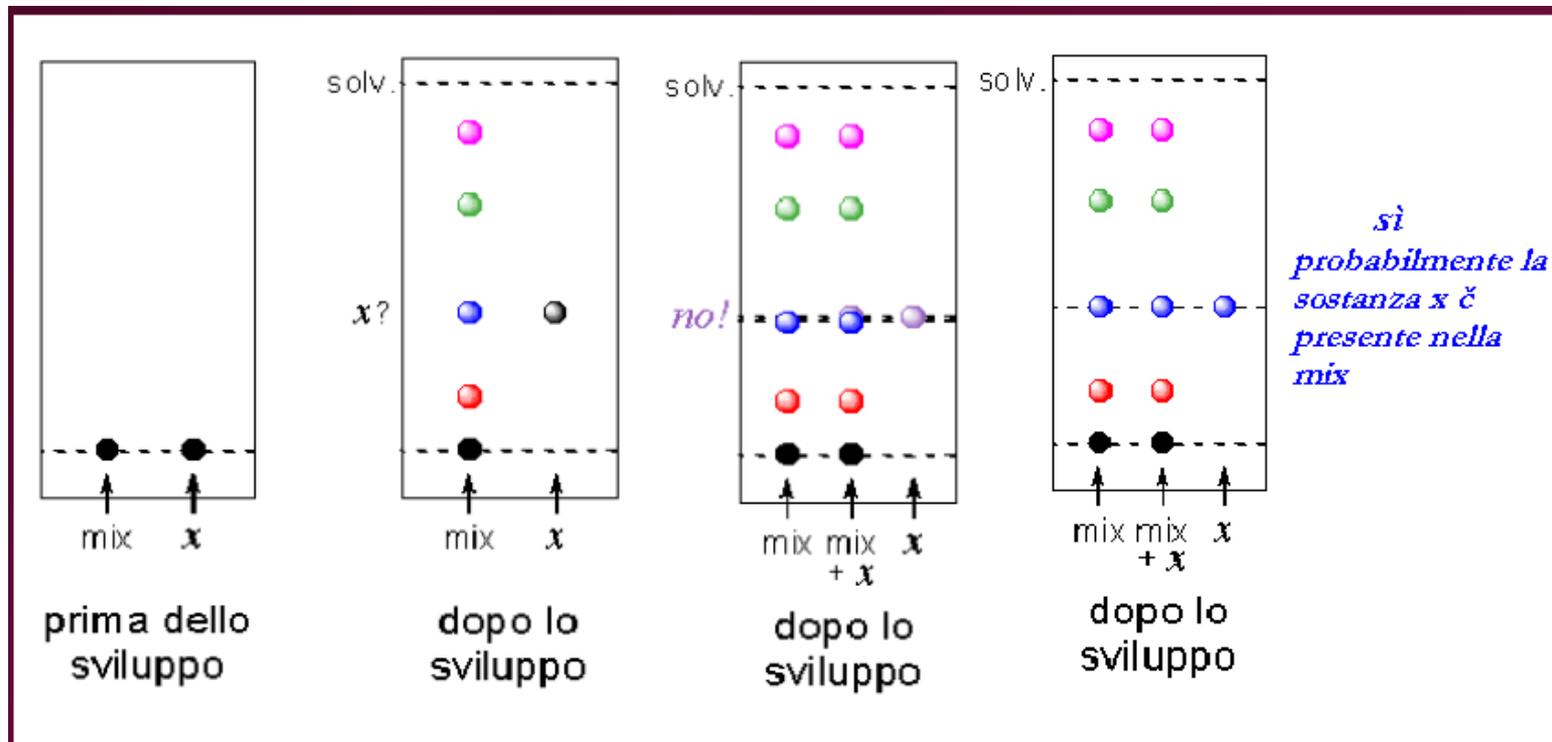


**Per un dato sistema cromatografico, il fattore di ritenzione di una sostanza è una costante caratteristica della stessa in condizioni sperimentali riproducibili!!!**

**Il fattore di ritenzione dipende da:**

- natura chimica e attività della fase stazionaria;
- struttura dei pori presenti nei granuli della fase stazionaria;
- spessore dello strato;
- temperatura e grado di saturazione dell'ambiente;
- composizione della fase mobile.

- I valori di  $R_f$  possono essere usati per identificare una sostanza per confronto con degli standard;
- Il valore di  $R_f$  non è una costante fisica ed il confronto DEVE ESSERE FATTO SOLO tra macchie presenti sulla stessa lastrina e sviluppate nello stesso modo e contemporaneamente;
- Due sostanze che hanno lo stesso valore di  $R_f$ , nelle medesime condizioni cromatografiche, potrebbero essere identiche; invece quelle che hanno diversi valori di  $R_f$  sicuramente non lo sono!



## LA QUALITÀ DELLE PRESTAZIONI DI UNA TLC :

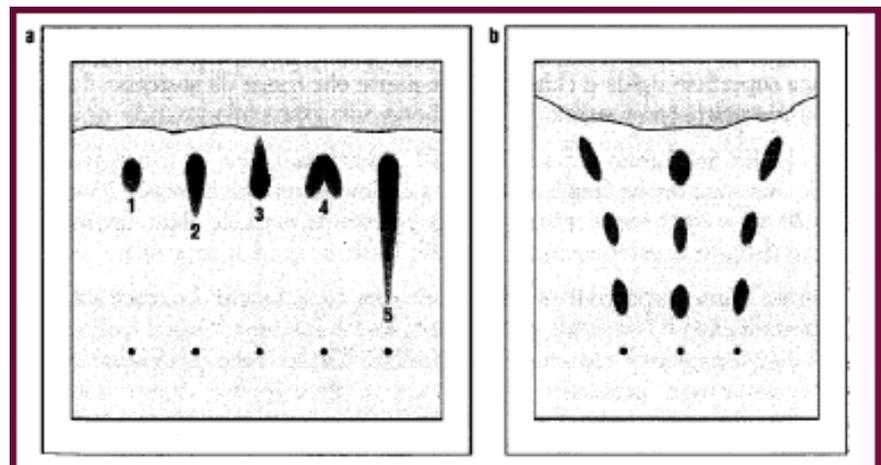
SELETTIVITÀ: è una misura della differenziazione del comportamento degli analiti nel sistema cromatografico

Fattore di ritenzione o di ritardo ( $R_f$ ) come:

$$R_f = \frac{D_i}{D_{el}}$$

Dove  $D_{el}$  e  $D_i$  sono rispettivamente la distanza percorsa dall'eluente e dal componente in esame.

**CAPACITÀ:** massima quantità di campione che può essere utilmente caricato sulla lastrina.



**EFFICIENZA:** attitudine del sistema a conservare compatta la macchia durante la corsa cromatografia; si quantifica con il cosiddetto numero di piatti teorici  $N$ .

Un **piatto teorico** è la più piccola zona adiacente in cui il soluto raggiunge un equilibrio tra fase mobile e stazionaria.

$$N = 16 \left( \frac{R_f \cdot D_{el}}{W_i} \right)^2$$

$w_i$ : larghezza della macchia del composto  $i$ -esimo.

Maggiore è  $N$  maggiore sarà la risoluzione e, quindi, tanto più compatte saranno le macchie al termine dell'eluizione.

L'efficienza dipende da:

- Granulometria: deve essere la più piccola possibile, pur consentendo velocità di flusso dell'eluente non troppo basse;
- Distribuzione granulometrica: deve essere la più piccola possibile;
- Qualità dell'impaccamento: lo strato sottile deve essere il più uniforme e omogeneo possibile;
- Geometria delle particelle: le particelle devono essere il più possibile sferiche.

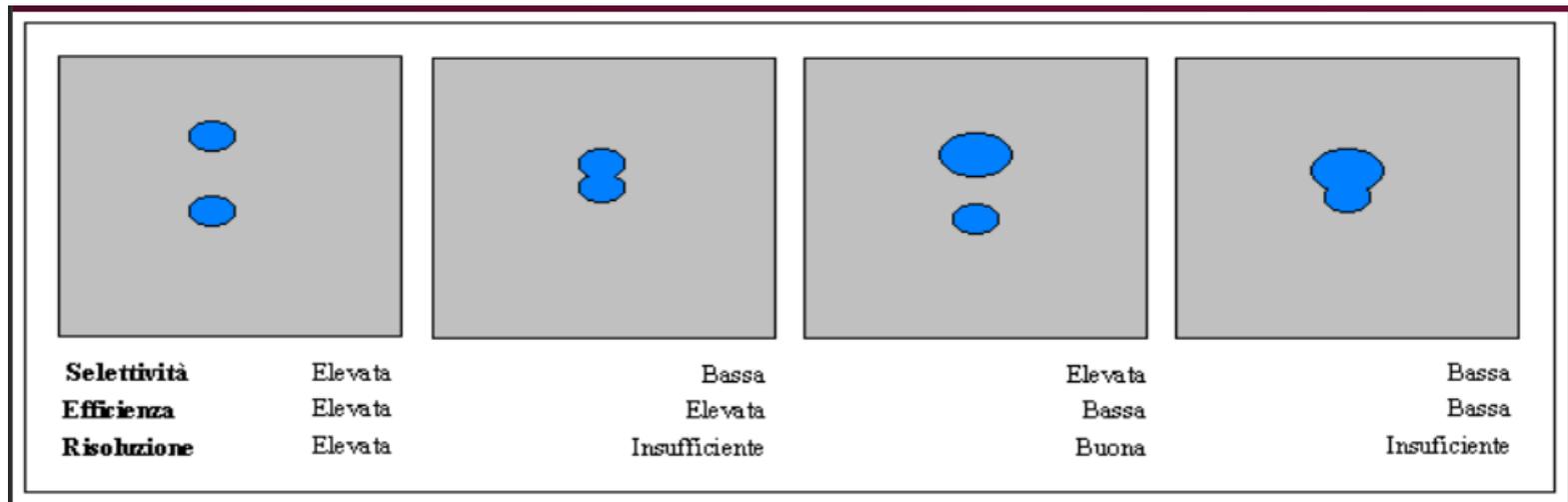
**RISOLUZIONE** ( $R_s$ ): attitudine del sistema a fornire alla fine della corsa cromatografica delle macchie ben distanziate.

Selettività

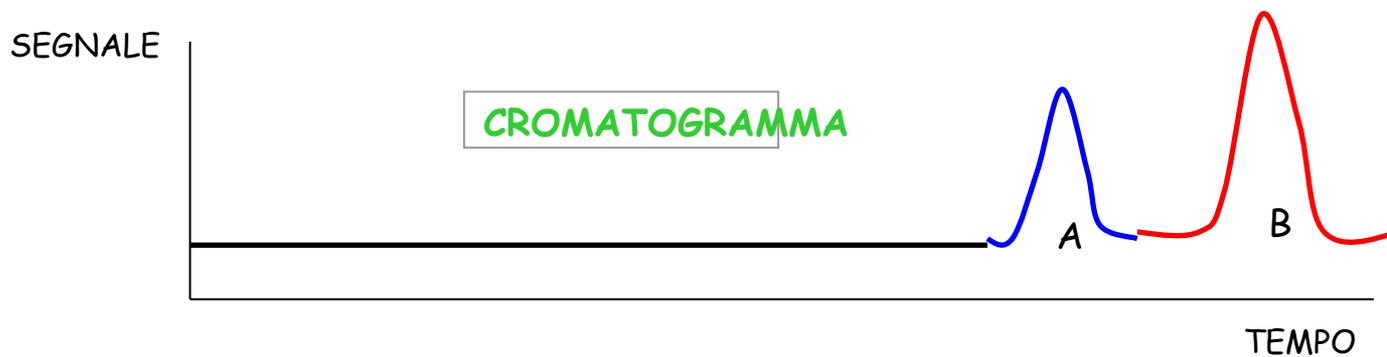
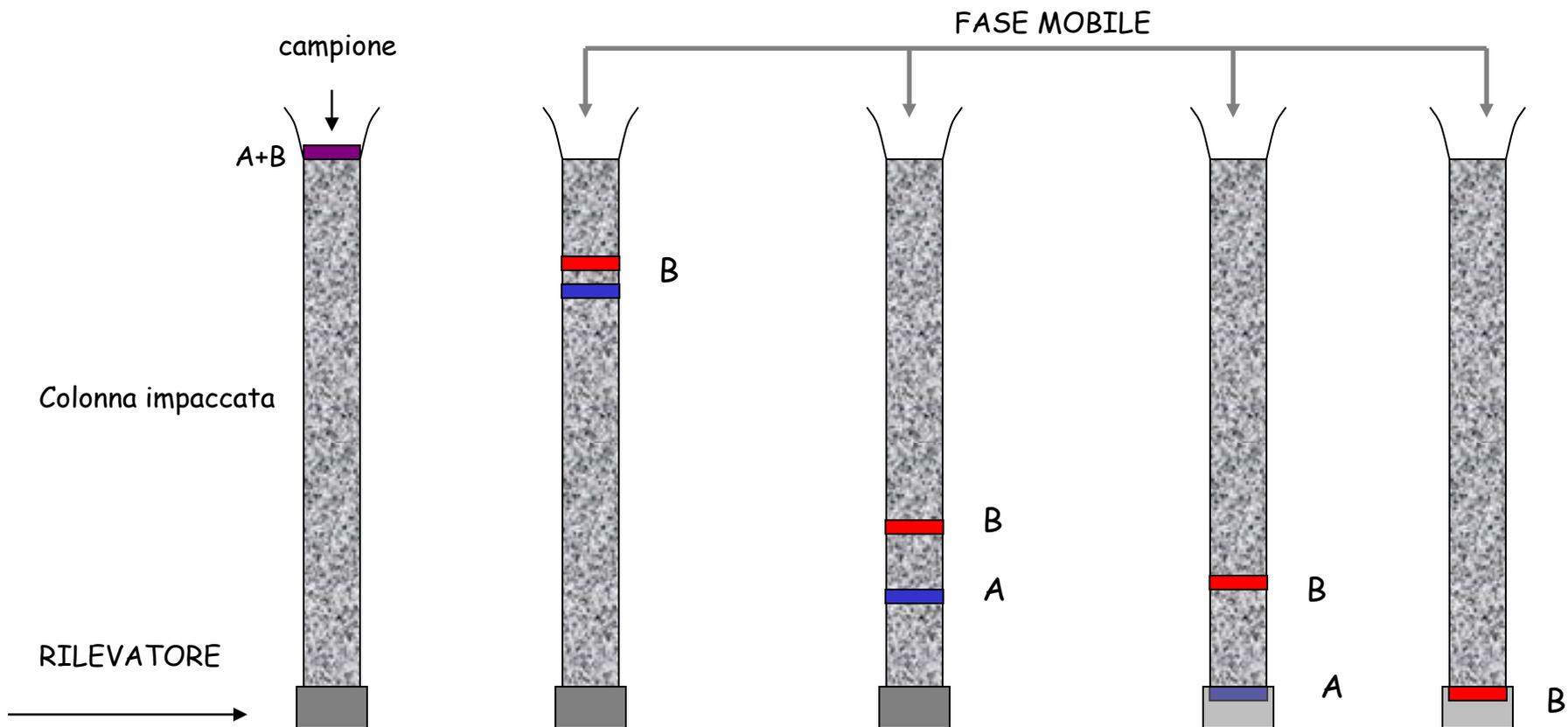


Risoluzione

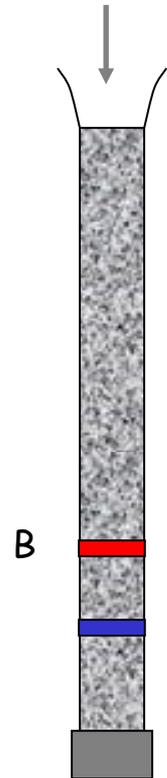
Efficienza



# Cromatografia su colonna



FASE MOBILE

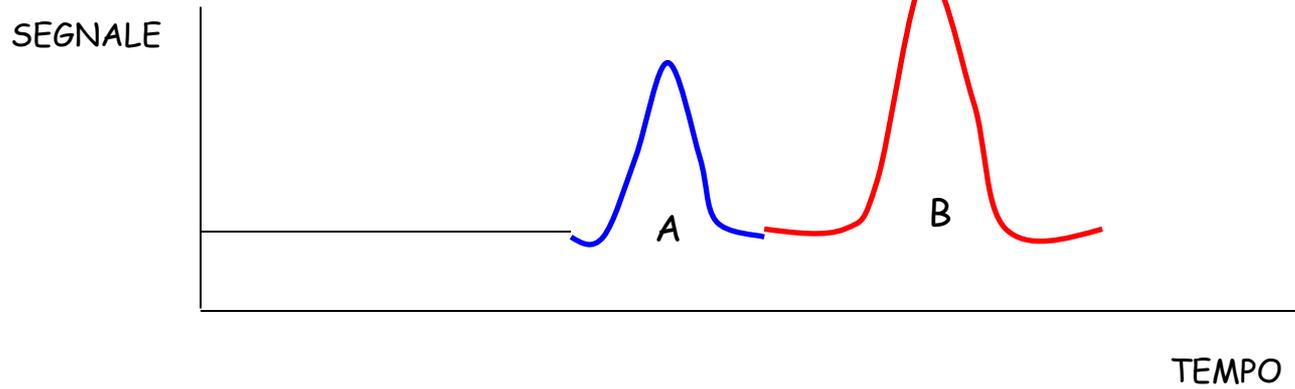


1. Il movimento lungo la colonna avviene solo quando il soluto si trova nella fase mobile
2. La velocità dipende quindi dal tempo che il soluto trascorre nella fase mobile

La frazione di tempo è piccola per composti molto **trattenuti (B)**, mentre è **grande per composti poco trattenuti (A)**.

La ripartizione di un soluto tra fase stazionaria e fase mobile determina quindi i tempi di eluizione, e la possibilità di separare miscele complesse.

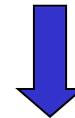
# CROMATOGRAMMA



Informazioni QUALITATIVE  
Informazioni QUANTITATIVE

POSIZIONE DEI PICCHI

DIMENSIONI (ALTEZZA E AREA) DEI PICCHI



NECESSITA' DI AVERE PICCHI BEN DEFINITI

La velocità dipende dai rapporti di ripartizione dei soluti nella FM e FS

Rapporto di ripartizione o coefficiente di ripartizione

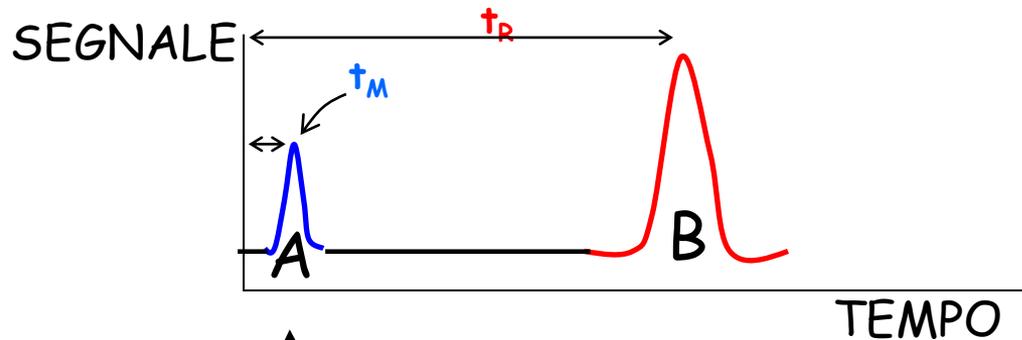


$$K = C_S / C_M$$



$$C_S = K C_M$$

Questa proporzionalità è valida in un ampio intervallo di concentrazione, ciò determina l'indipendenza del tempo di eluizione dalla concentrazione



Specie non trattenuta

$t_R$ : tempo che passa tra l'iniezione di un campione in colonna e la comparsa di un picco sul cromatogramma

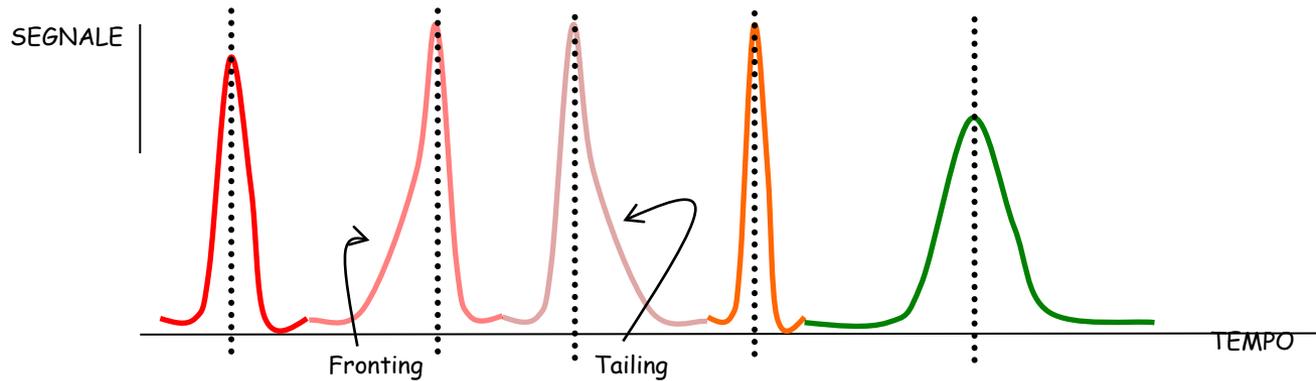


Velocità media lineare del soluto e della fase mobile

$$v = L / T_R$$

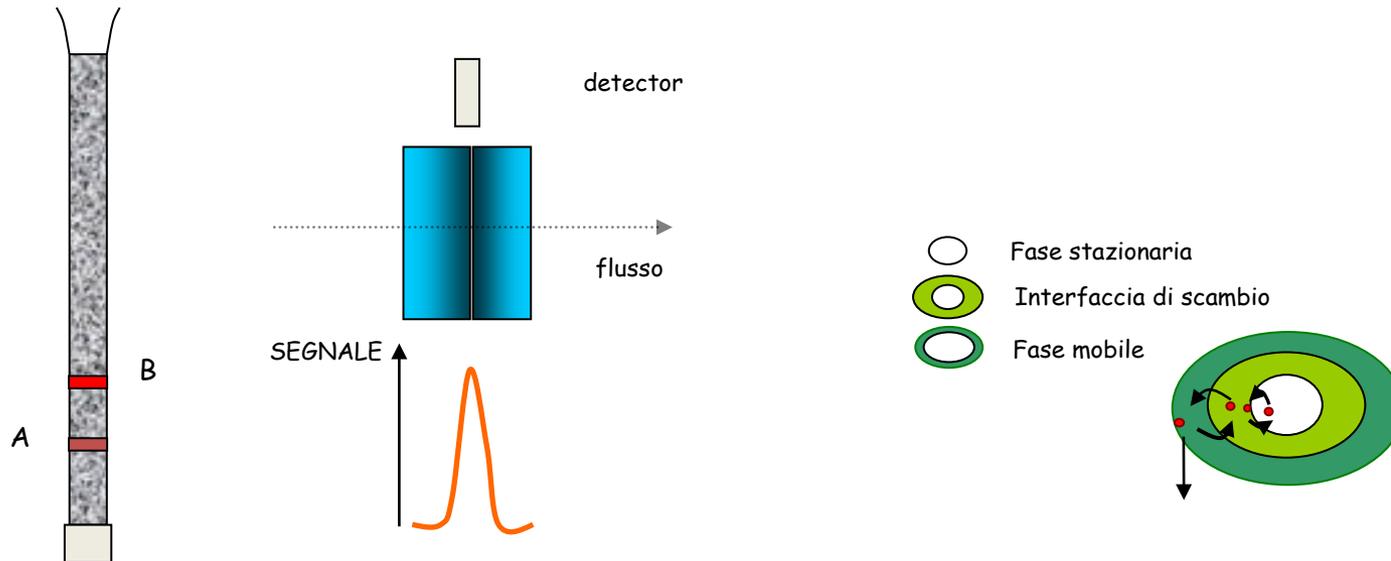
$$u = L / T_M$$

## Geometria del picco e efficienza della colonna



Tailing e fronting sono prodotti da un coefficiente di distribuzione non lineare

## variazione di geometria del picco

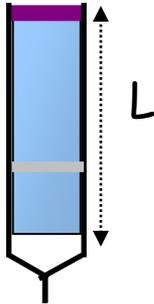


considerando che una molecola è capace di effettuare migliaia di trasferimenti fase mobile-fase stazionaria possiamo immaginare il picco come centrato sul valore effettivo di  $t_R$  attorno al quale c'è una distribuzione di errori "casuali" di percorso

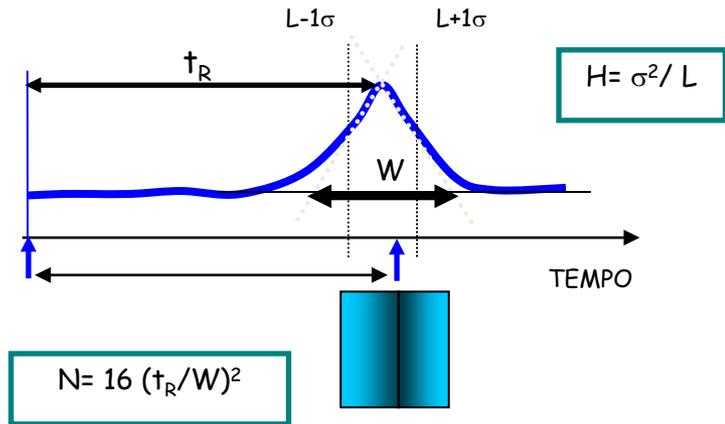
# Efficienza di una colonna cromatografica

Altezza di un piatto teorico  $H$   
Numero di un piatti teorici  $N$

$$N = L/H$$



L'efficienza di una colonna è proporzionale ad  $N$ , quindi *inversamente* proporzionale *all'altezza* di un piatto.



Intensità di colore = numero di molecole di analita

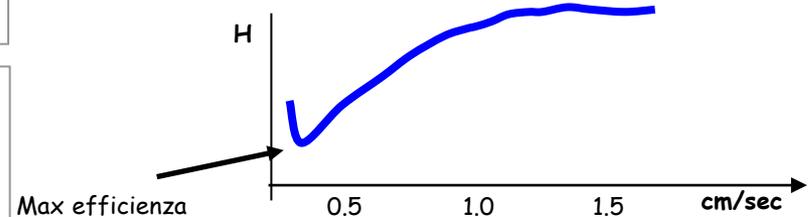
# Variabili che influenzano l'efficienza di una colonna

- **Velocità lineare della fase mobile**
- **Coefficiente di diffusione nella fase mobile ( $D_M$ )**
- **Coefficiente di diffusione nella fase stazionaria ( $D_S$ )**
- **Fattore di capacità**
- **Diametro delle particelle della fase stazionaria impaccata**
- **Spessore del film liquido sulla fase stazionaria**

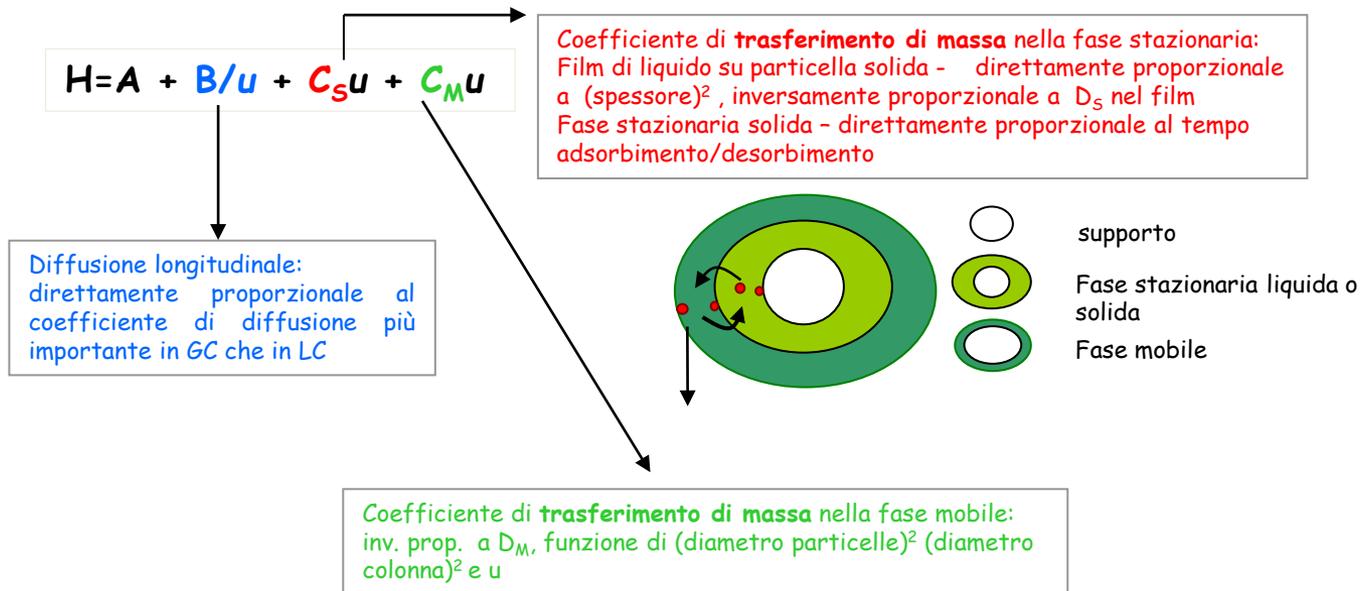
➤ **Velocità lineare della fase mobile**

➤ **Cromatografia liquida colonne 25-50 cm**

➤ **Gas-cromatografia fino a decine di m**

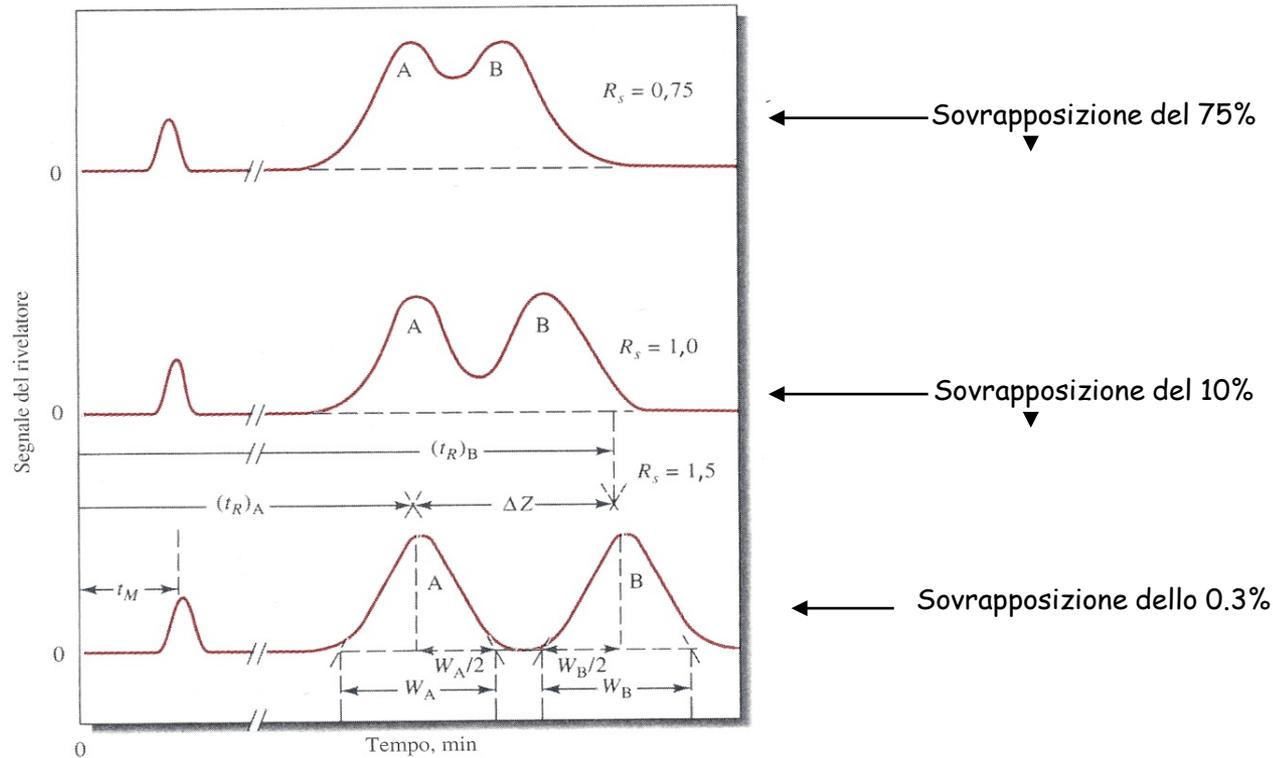


# Teoria dell'allargamento della banda; equazione di Van Deemter



# Risoluzione di una colonna

$$R_s = \frac{2\Delta Z}{W_A + W_B} = \frac{2[(t_R)_B + (t_R)_A]}{W_A + W_B}$$



# TECNICHE DI SEPARAZIONE

Le fasi stazionarie in HPLC sono costituite da particelle di silice (più raramente allumina) che funzionano da ADSORBENTI (cromatografia di adsorbimento = LSC) o da SUPPORTO (cromatografia di partizione = LLC).

La diffusione della silice è giustificata da alcune sue proprietà specifiche:

- è in grado di sopportare pressioni molto elevate ( $> 1000$  atm);
- è chimicamente stabile verso tutti i solventi a pH non superiore a 8;
- è facilmente funzionalizzabile (derivatizzabile);
- è facile ottenerla sottoforma di particelle uniformi;
- è disponibile in varie dimensioni e porosità (60-100 Å).

Nella *Bonded Phase Chromatography* (BPC), che è una cromatografia di partizione, le particelle di supporto sono legate a dei composti organici.

Nella *Size Exclusion Chromatography* (SEC) le particelle di supporto hanno una porosità controllata e separano i soluti in funzione della loro dimensione molecolare (che è cosa diversa dal loro peso molecolare).

Nella *Ion Exchange Chromatography* (IEC) i gruppi ionici (cationici od anionici) sono legati chimicamente alla superficie del supporto.

La complessità della correlazione soluto/fase stazionaria/fase mobile rende conto del perché, in generale, in tutte le tecniche di separazione LC si utilizza una grandissima varietà di solventi; la polarità della fase mobile, anche se non è l'unico, è *il più importante fattore* che produce una migliore solvatazione del soluto e dunque una più veloce eluizione.

Questa necessità di variare la composizione della fase mobile per ottimizzare le separazioni dei soluti è alla base della classificazione delle tipologie di eluizione della LC:

**a. ELUIZIONE ISOCRATICA**

La composizione della fase mobile rimane costante per tutto il tempo dell'eluizione.

**b. ELUIZIONE A GRADIENTE**

La composizione della fase mobile viene fatta variare durante l'eluizione (con aumento della percentuale del solvente più polare), allo scopo di separare tutti i soluti, anche quelli che hanno fattori di capacità ( $k'$ ) molto diversi.

# CROMATOGRAFIA DI ADSORBIMENTO

*(Liquid Solid Chromatography)*

FASE MOBILE: liquido

FASE STAZIONARIA: solido adsorbente

La separazione si basa sull'assorbimento dei soluti sulla superficie della fase stazionaria, dotata di siti attivi che danno luogo a interazioni *non specifiche* (forze di dispersione di Van der Waals) e *specifiche* (legami idrogeno, interazioni dipolo-dipolo).

Le fasi stazionarie adsorbenti più utilizzate nella LSC sono la silice ( $\text{SiO}_2$ ) e l'allumina ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ), anche se la silice è preferita per la sua maggiore capacità di carica, ma anche perché è attiva sia con i gruppi silanolicci liberi (*fase diretta*) che con i gruppi silanolicci funzionalizzati (*fase inversa*). I siti attivi della fase stazionaria sono sempre ricoperti da molecole del solvente (*solvatazione della fase stazionaria*), così come il solvente circonda le molecole di soluto (*solvatazione del soluto*). Il soluto proveniente dalla fase mobile "sposta", per competizione, dalla superficie della fase stazionaria un certo numero di molecole di solvente.

## B) CROMATOGRAFIA DI RIPARTIZIONE

*(Liquid Liquid Chromatography)*

FASE MOBILE: liquido

FASE STAZIONARIA: liquido (su supporto solido inerte o a fase legata)

La separazione si basa sulla ripartizione del soluto tra la fase mobile liquida e la fase stazionaria (liquido su supporto solido inerte o film di gruppi organici legati chimicamente al supporto solido inerte). Questa distinzione comporta una prima classificazione della LC di partizione:

1. a fase legata (BPC = *Bonded Phase Chromatography*)
2. a fase non legata (LLC = *Liquid Liquid Chromatography*)

# CROMATOGRAFIA A FASE LEGATA (BPC)

Ha quasi completamente sostituito la più tradizionale cromatografia liquido-liquido (con la quale si ha perdita di fase stazionaria ed è difficile operare con eluizioni a gradiente). I gruppi organici che si fissano chimicamente sulla superficie del supporto possiedono una certa mobilità conformazionale che conferisce loro un comportamento simile a quello di un liquido (stato pseudo-liquido).

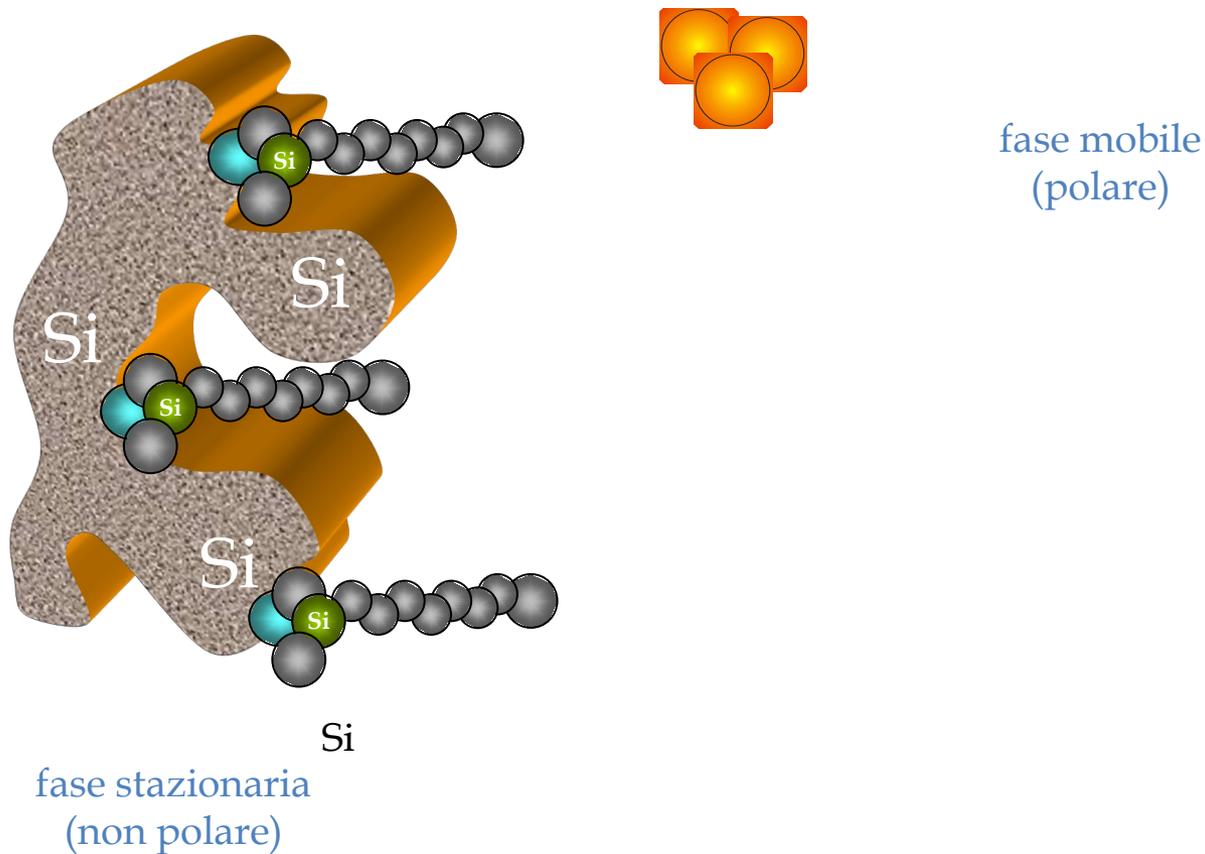
La BPC può essere:

1. IN FASE INVERSA { FASE MOBILE: polare ( $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CH}_3\text{OH}$ ,  $\text{CH}_3\text{CN}$ )  
FASE STAZIONARIA: non polare (  $\text{Si-O-SiR}_3$ )  
SOLUTI: non polari

2. IN FASE DIRETTA { FASE MOBILE: non polare ( $\text{nC}_6\text{H}_{14}$ ,  $\text{Et}_2\text{O}$ ,  $\text{CHCl}_3$ )  
FASE STAZIONARIA: polare (  $\text{Si-OH}$ )  
SOLUTI: polari

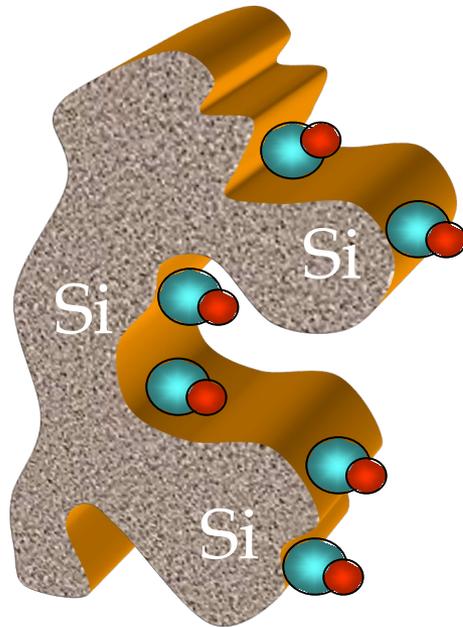
# CROMATOGRAFIA IN FASE INVERSA

*Reverse Phase Chromatography (RPC)*

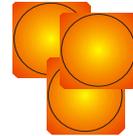


# CROMATOGRAFIA IN FASE DIRETTA

*Normal Phase Chromatography (NPC)*



fase stazionaria  
(polare)



fase mobile  
(non polare)

# 1. CROMATOGRAFIA IN FASE INVERSA

## *(Reverse Phase Chromatography)*

### a. FASE STAZIONARIA

Si utilizzano materiali diversi:

- silice
- allumina
- carbone pirolitico
- polimeri (polietilene) e copolimeri (stirene/ divinilbenzene)

La silice è il materiale più utilizzato perché la tecnologia attuale consente di ottenere particelle di dimensioni e porosità controllate, oppure particelle con uno strato pellicolare poroso. Inoltre è il materiale che può essere più facilmente funzionalizzato.



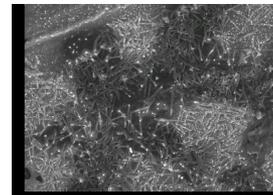
silice



allumina



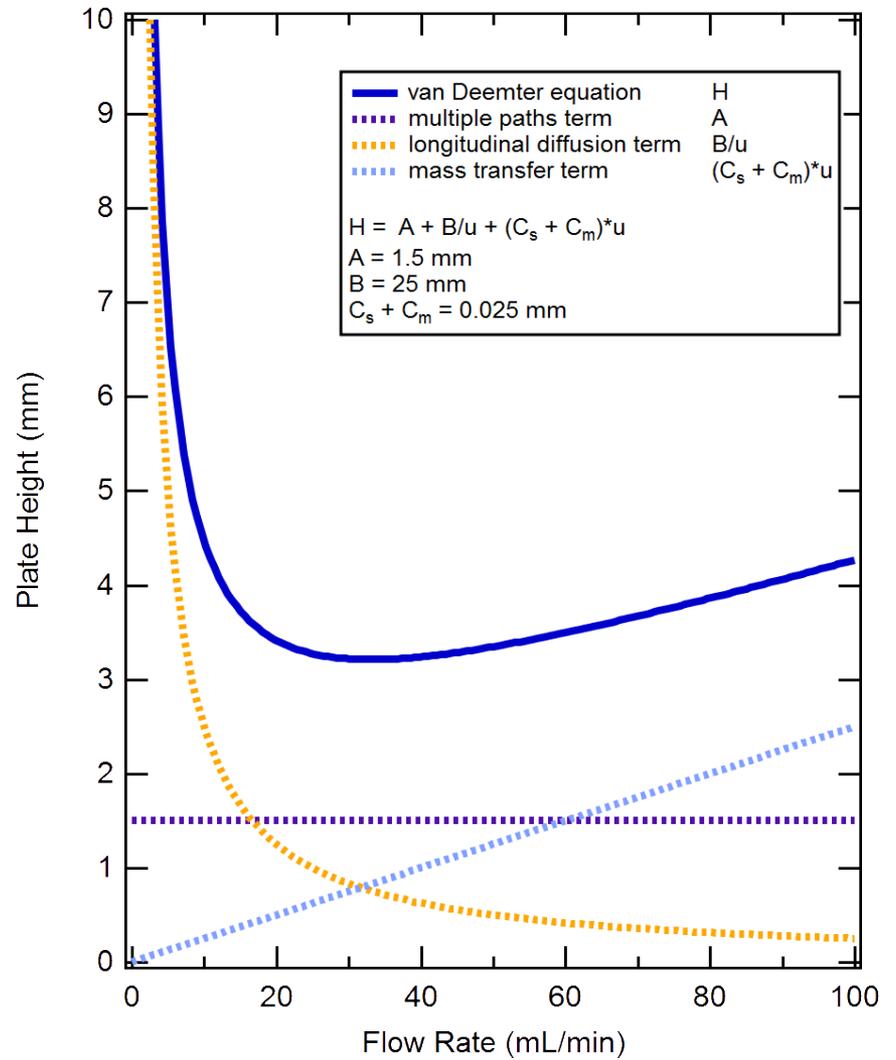
carbone pirolitico



resine



$$H = A + B/u + C_s u + C_m u$$



# HPLC

Quando il flusso dell'eluyente è forzato in colonna, esso genera una contropressione.

La relazione tra questa contropressione  $\Delta P$  e le altre variabili cromatografiche è data da:

$$\Delta P = \frac{\eta L v}{\Theta d_p^2}$$

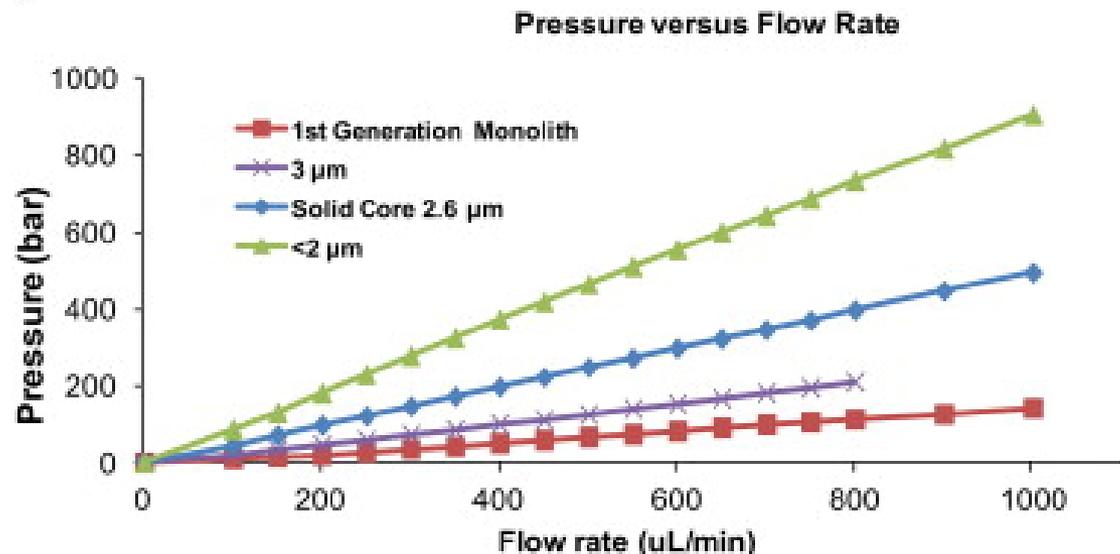
Dove:  $\eta$  = viscosità della fase mobile

$v$  = velocità lineare della fase mobile

$L$  = lunghezza della colonna

$d_p$  = diametro medio delle particelle

$\Theta$  = costante



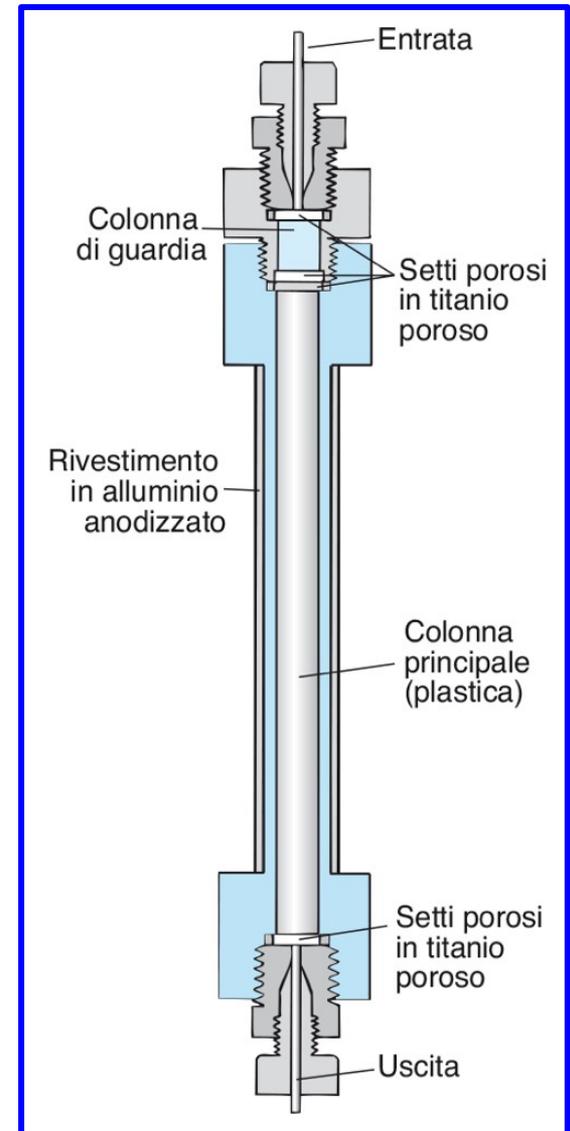
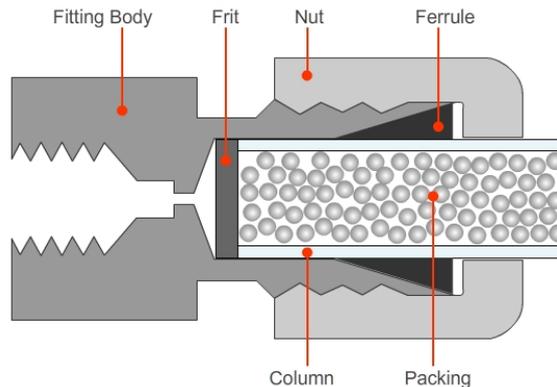
## COLONNE IMPACCATO PER HPLC

### Colonne

Sono tipicamente cilindri cavi in acciaio, alluminio o plastica (eventualmente circondati da una camicia in alluminio) di lunghezza da 5 a 30 cm e diametro interno da 2 a 10 mm, riempiti con particelle di materiale di supporto di diametro 1-10  $\mu\text{m}$  (a cui corrisponde un numero di piatti teorici da 40000 a 60000 per metro).

I setti porosi in titanio distribuiscono uniformemente nella colonna la fase mobile entrante attraverso un sottile tubicino.

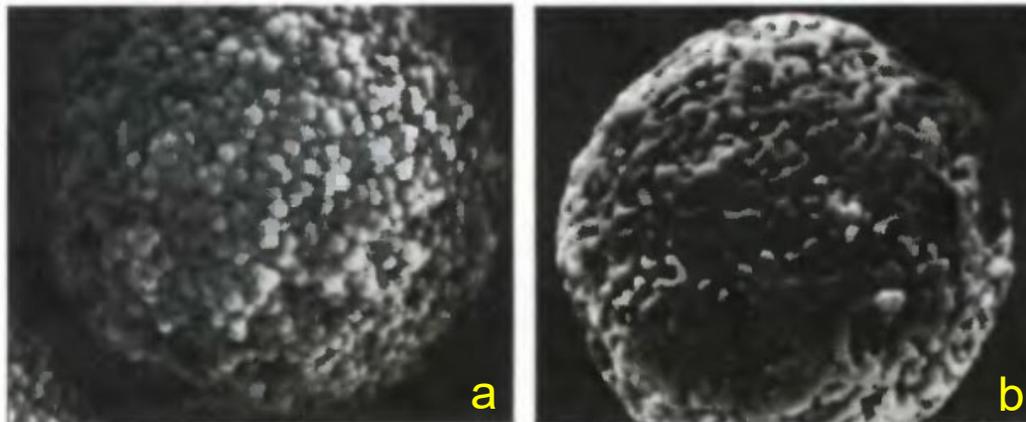
La colonna di guardia (che può essere anche esterna) funge da colonna "sacrificale", catturando particelle di grandi dimensioni, sfuggite alla filtrazione dei solventi, che potrebbero otturare la colonna analitica.



## Particelle di impaccamento

Sono tipicamente realizzate in materiale siliceo (come in GC) e si distinguono in due principali categorie.

- ◆ Particelle pellicolari - hanno diametro variabile da 30 a 40  $\mu\text{m}$ , ricoperte in superficie da un sottile strato (1-2  $\mu\text{m}$ ) di fase stazionaria. Si usano ormai soprattutto per le colonne di guardia (precolonne).
- ◆ Particelle porose - hanno diametro variabile tra 1 e 10  $\mu\text{m}$  e sono dotate di canalicoli interni il cui foro di accesso ha un diametro di 100-500  $\text{\AA}$ . Sono costituite o da aggregati di particelle silicee porose di piccole dimensioni (a) o da strutture a spugna (b), caratterizzate da canalicoli.



## Confronto fra le caratteristiche delle particelle pellicolari e porose

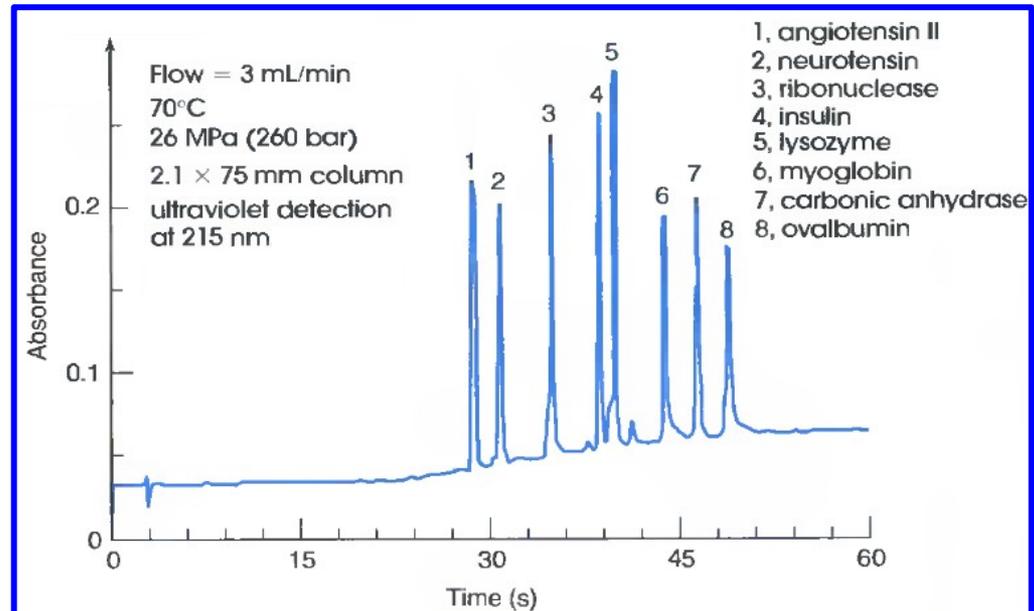
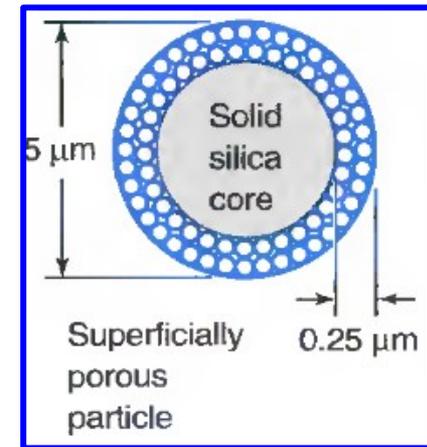
Proprietà	Particelle pellicolari	Particelle porose
Altezza di piatto teorico (mm)	0.2-0.4	0.01-0.03
Lunghezza di colonna (cm)	50-100	10-30
Diametro di colonna (mm)	2	3-5
Caduta di pressione (psi/cm)	0.5	5
Area superficiale (m <sup>2</sup> /g)	10-15	400-600
Impaccamento	Semplice, a secco	Complesso e costoso

## Tipologie di colonne HPLC di sviluppo più recente

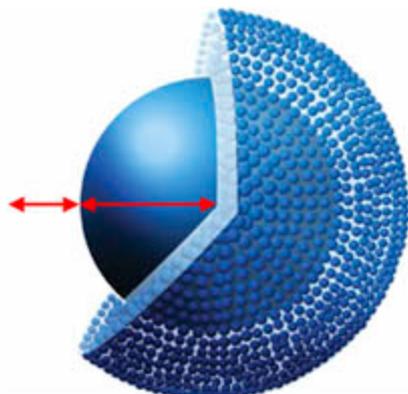
### Colonne impaccate con particelle *core-shell*

Le particelle *core-shell* hanno un nucleo di silice non porosa circondato da un sottile strato di silice porosa.

La diminuzione della superficie interfacciale fra fase stazionaria e mobile, rispetto alle particelle porose, è compensata dalla diminuzione del contributo del termine  $C_M$  nell'equazione di Van Deemter, con conseguente incremento dell'efficienza.

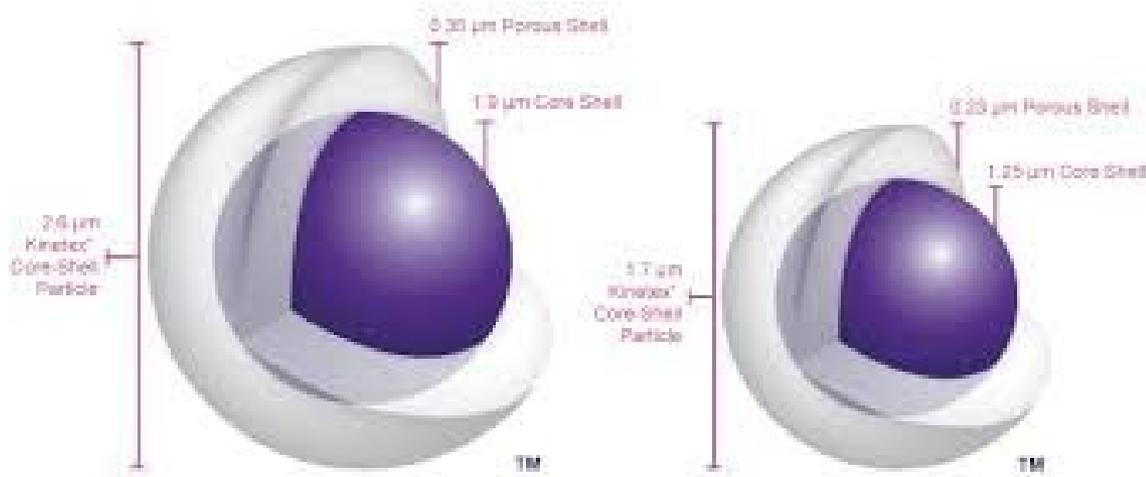


# Particelle Core-Shell

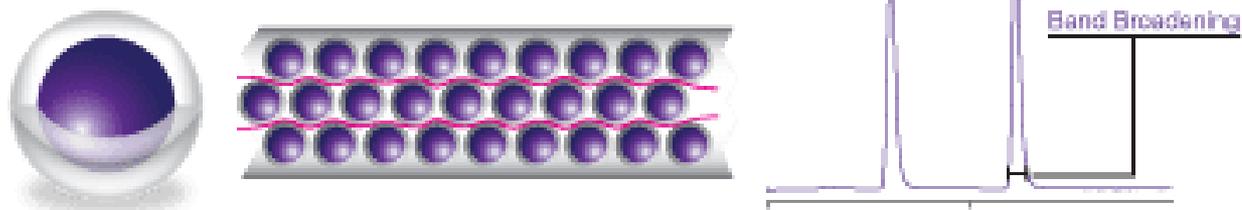


Fully Porous	vs	Kinetex Core-Shell	Average Efficiency Gain with Kinetex*
5 $\mu\text{m}$		5 $\mu\text{m}$	90% Higher
3 $\mu\text{m}$		2.6 $\mu\text{m}$	85% Higher
1.7 $\mu\text{m}$		1.7 $\mu\text{m}$	20% Higher
1.7 $\mu\text{m}$		1.3 $\mu\text{m}$	50% Higher

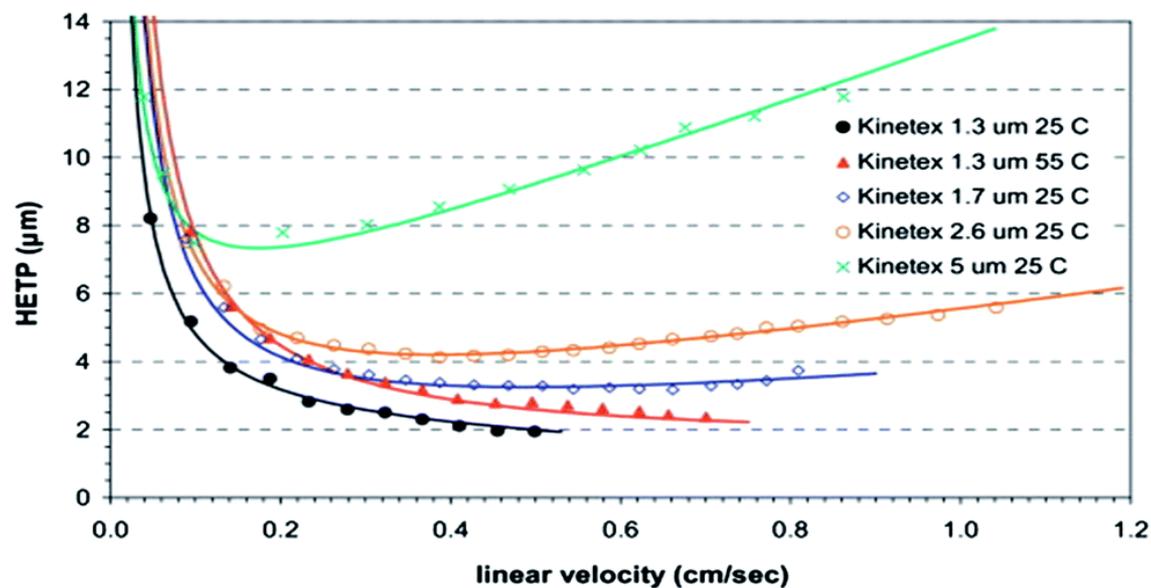
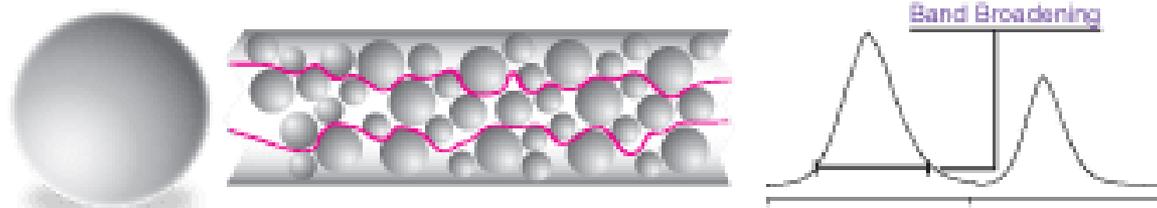
\* May not be representative of all separations.



### Kinetex Core-Shell



### Fully Porous

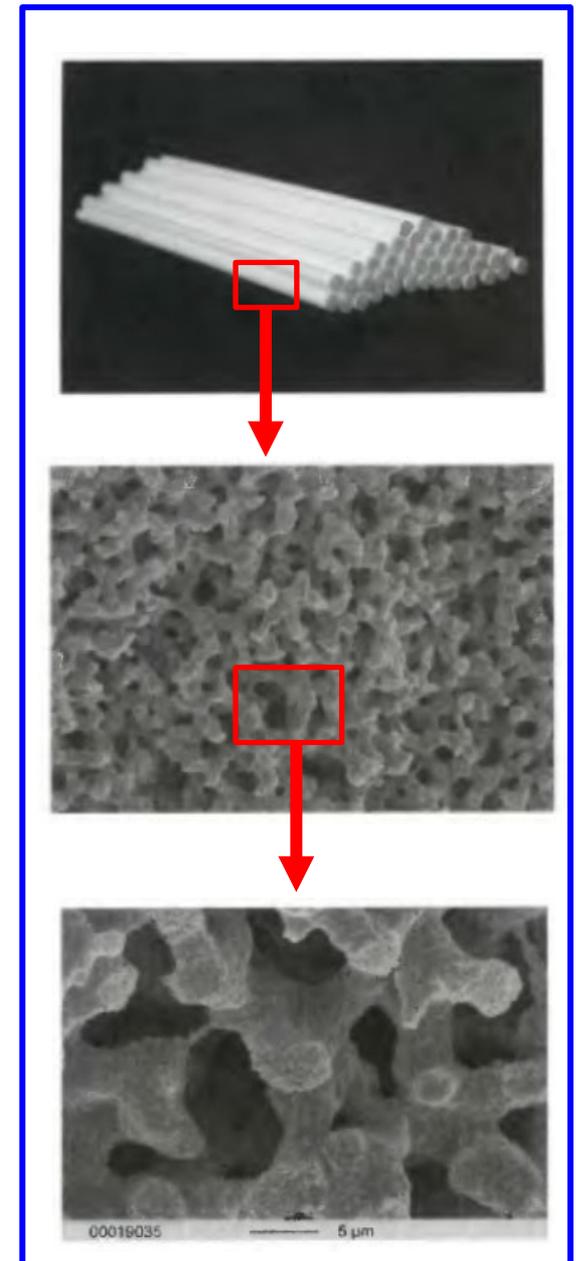


## Colonne monolitiche

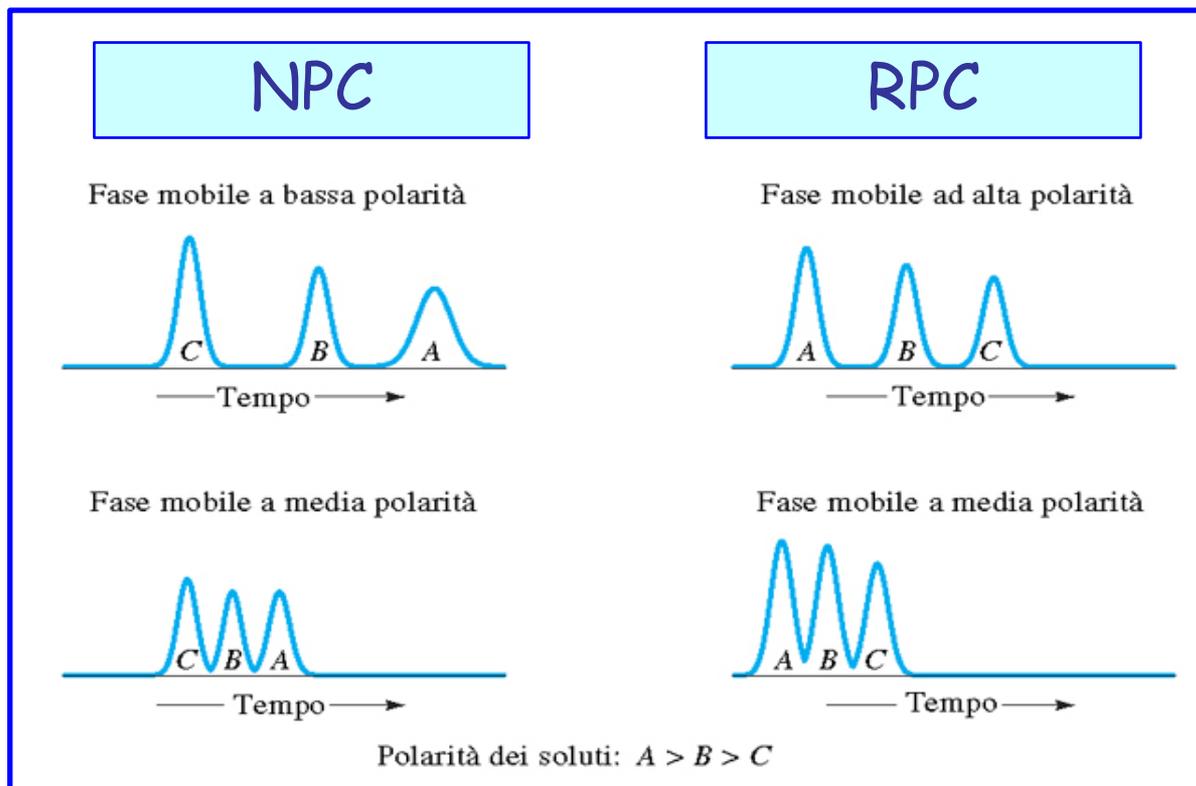
Le colonne monolitiche sono realizzate incastonando in un cilindro in materiale plastico una barra cilindrica di silice ottenuta per polimerizzazione di precursori in soluzione.

La silice così ottenuta è estremamente porosa (l'80% del volume di una barra è vuoto) e caratterizzata da pori principali di diametro circa  $2\ \mu\text{m}$  e pori molto più piccoli (13 nm) posizionati sullo scheletro di silice.

La struttura aperta e rigida della silice monolitica abbatte la contropressione incontrata dalla fase mobile, consentendo di lavorare a flussi molto elevati (anche 10 mL/min).

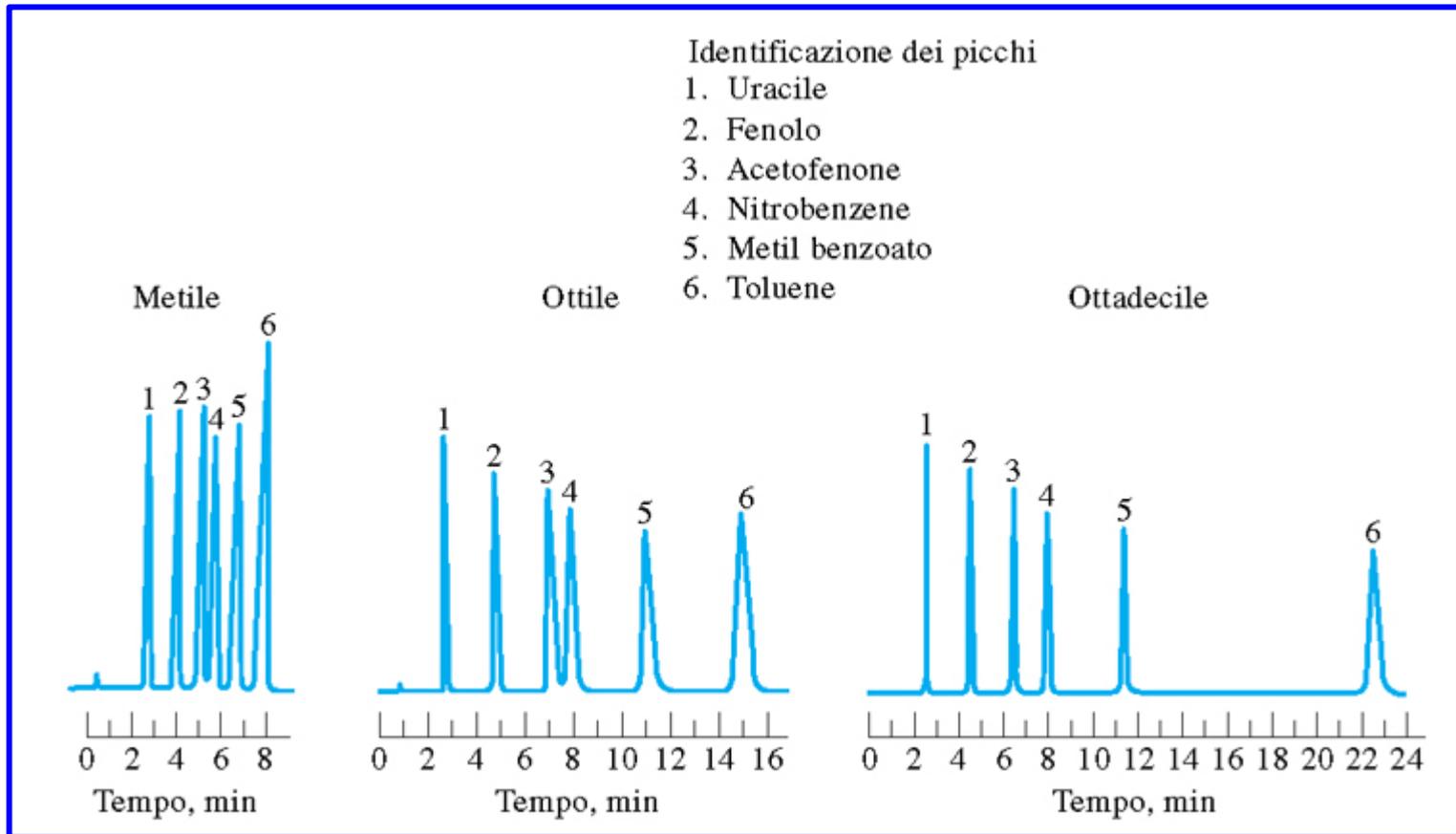


Si possono fare delle previsioni sui tempi di ritenzione in base alla polarità degli analiti da separare:



- in NPC eluiscono più tardi i composti più polari e i loro tempi di ritenzione possono essere diminuiti aumentando la polarità della fase mobile
- in RPC eluiscono più tardi i composti meno polari e i loro tempi di ritenzione possono essere diminuiti riducendo la polarità della fase mobile

## Effetto della variazione di fase stazionaria in RPC: un esempio



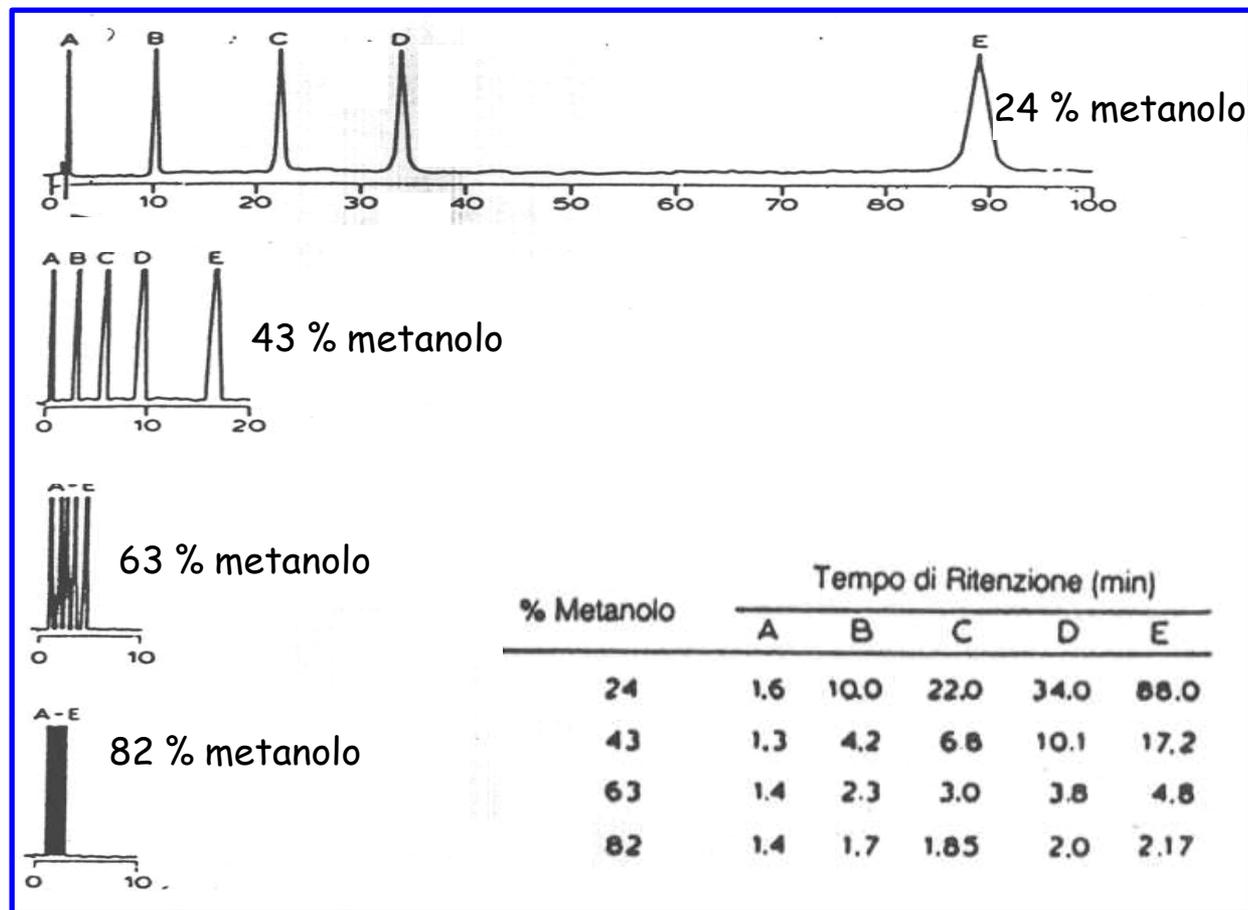
La diminuzione della polarità della fase stazionaria ( $C1 \rightarrow C8 \rightarrow C18$ ) aumenta il tempo di ritenzione dei composti meno polari, migliorando la separazione, anche se a scapito del tempo totale di analisi.

## Effetto della variazione di fase mobile in RPC: un esempio

Separazione su  
colonna C18 di:

- A. uracile
- B. fenolo
- C. benzaldeide
- D. nitrobenzene
- E. metil-benzoato

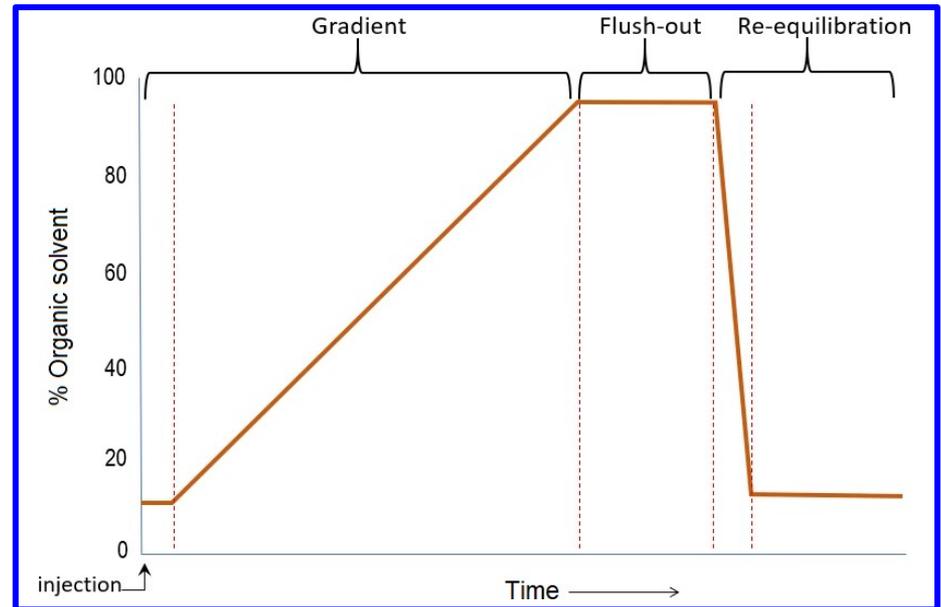
Fase mobile:  
acqua-metanolo



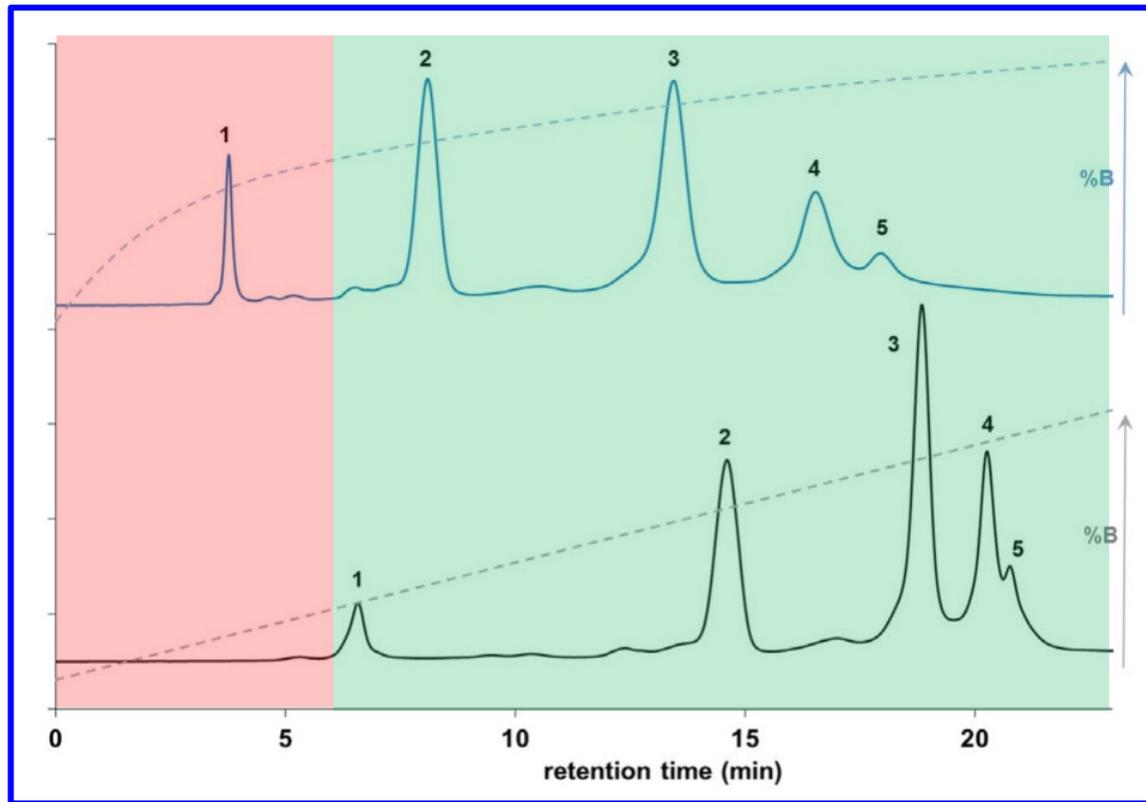
L'aumento della percentuale di metanolo abbassa la polarità complessiva della fase mobile, avvicinando gli analiti meno polari (C, D, E) a quelli più polari. La condizione ideale corrisponde al 43 % di metanolo.

## RPC con eluizione a gradiente

- Non sempre è possibile separare tutti gli analiti in miscele complesse adoperando una fase mobile a composizione costante, ossia in **modalità isocratica**.
- L'alternativa consiste nell'**eluizione a gradiente**, ossia la variazione progressiva della composizione della fase mobile durante la separazione.
- Nel caso di una separazione RPC si **aumenta progressivamente la percentuale del/dei solventi organici (meno polari) mescolati all'acqua nella fase mobile**.



L'incremento non lineare del solvente organico (B) può consentire di separare meglio picchi non ben separati con un gradiente lineare:



Nella zona rossa la pendenza del gradiente curvo è superiore a quella del gradiente lineare e questo fa arretrare i picchi, in particolare il picco 1. Nella zona verde la pendenza del gradiente curvo è inferiore a quella del gradiente lineare e questo facilita la separazione fra i picchi 3, 4 e 5.

## RPC con analiti ionici o ionizzabili

Analiti ionici o ionizzabili possono essere separati e analizzati con la cromatografia di ripartizione in fase inversa purché la loro carica sia soppressa preventivamente.

### Soppressione per effetto del pH

- ❖ **Analiti debolmente acidi:** l'uso di fasi mobili tamponate a  $\text{pH} < \text{pK}_a$  consente di far prevalere la forma indissociata, ossia non ionica, in colonna:

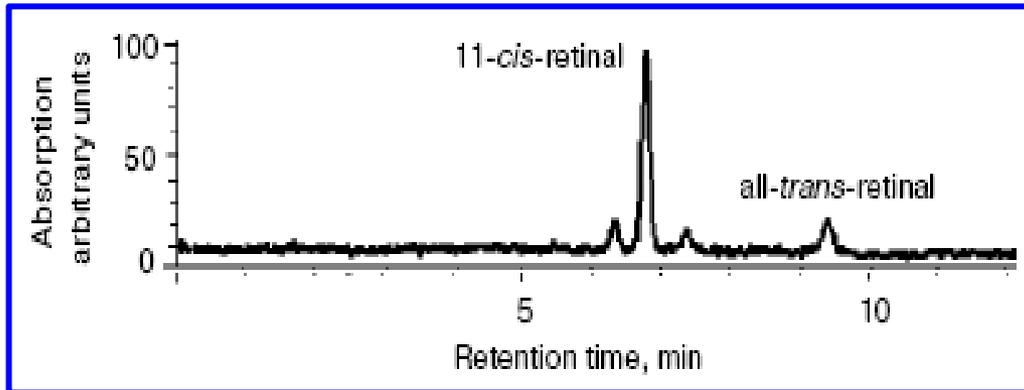


- ❖ **Analiti debolmente basici:** l'uso di fasi mobili a  $\text{pH} > \text{pK}_b$  consente di far prevalere la forma non protonata in colonna



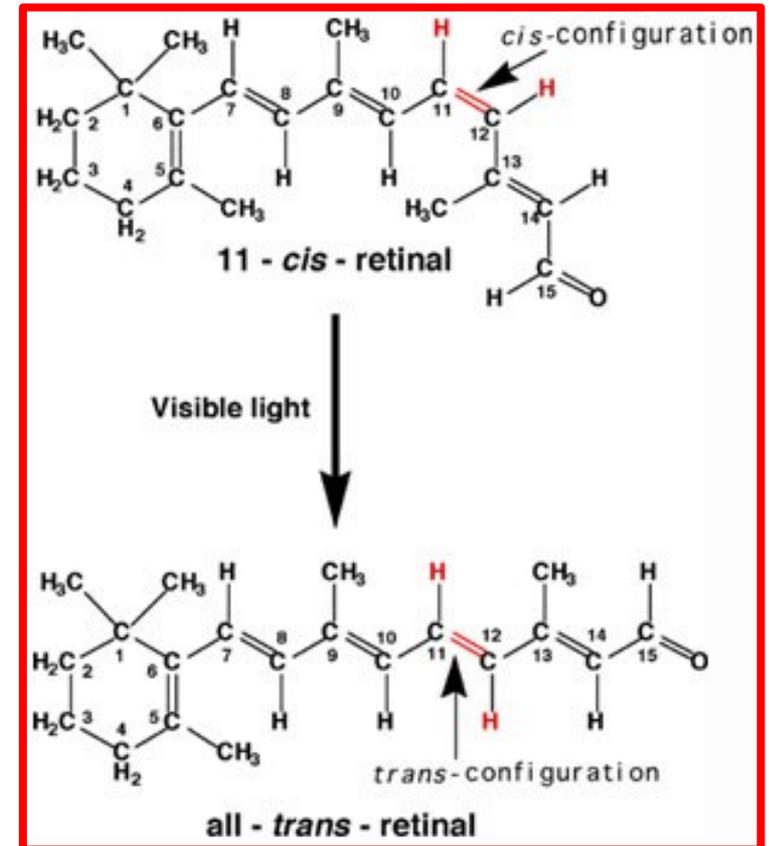
Per colonne RPC a fase legata il pH dev'essere però mantenuto nell'intervallo 2-8 per evitare l'idrolisi acida o basica dei legami silossanici presenti nella fase legata.

In molti casi la tecnica NPC è in grado di separare composti isomerici, perfino isomeri geometrici, ossia che differiscono unicamente per la configurazione dei legami C=C, come l'11 cis-retinale e il retinale completamente trans, coinvolti nel meccanismo della visione:



Separazione NPC su una colonna a fase stazionaria silicea con fase mobile costituita da etil acetato in *n*-esano.

Rivelazione spettrofotometrica a 365 nm.

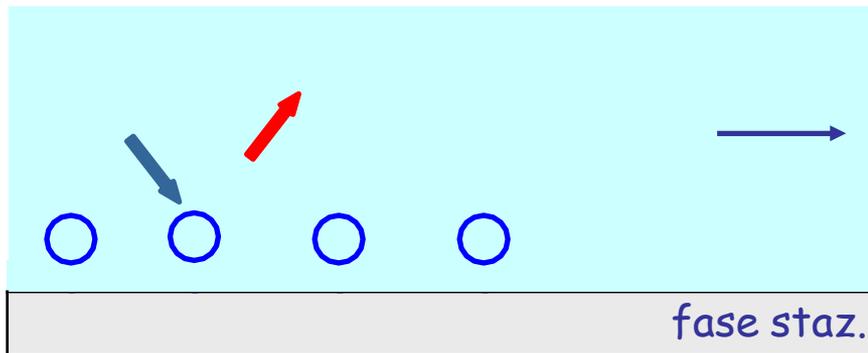


## Cromatografia a scambio ionico

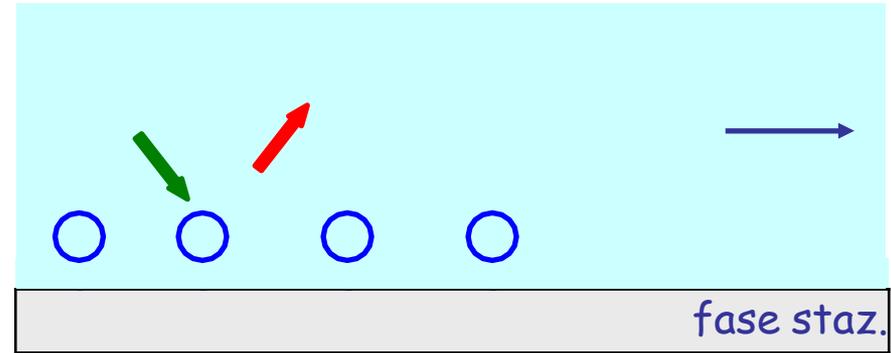
In questo caso gli analiti da separare sono ioni e la diversa ritenzione dipende da **equilibri di scambio** che avvengono in corrispondenza di gruppi ionici presenti sulla fase stazionaria.

Gli analiti con carica e/o dimensioni maggiori tendono ad essere ritenuti più a lungo.

scambio cationico

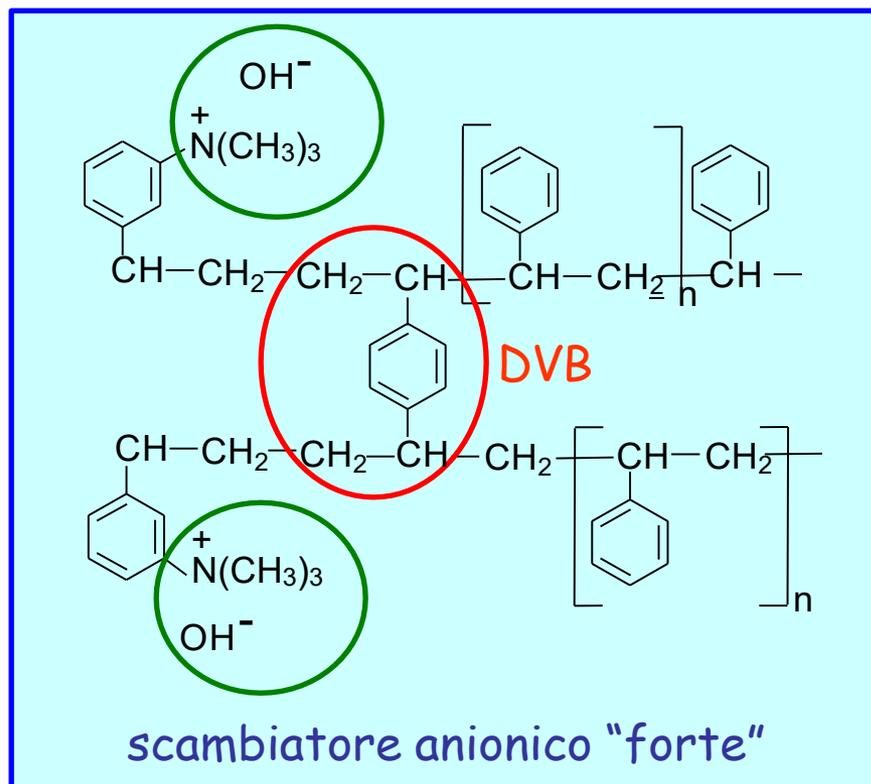
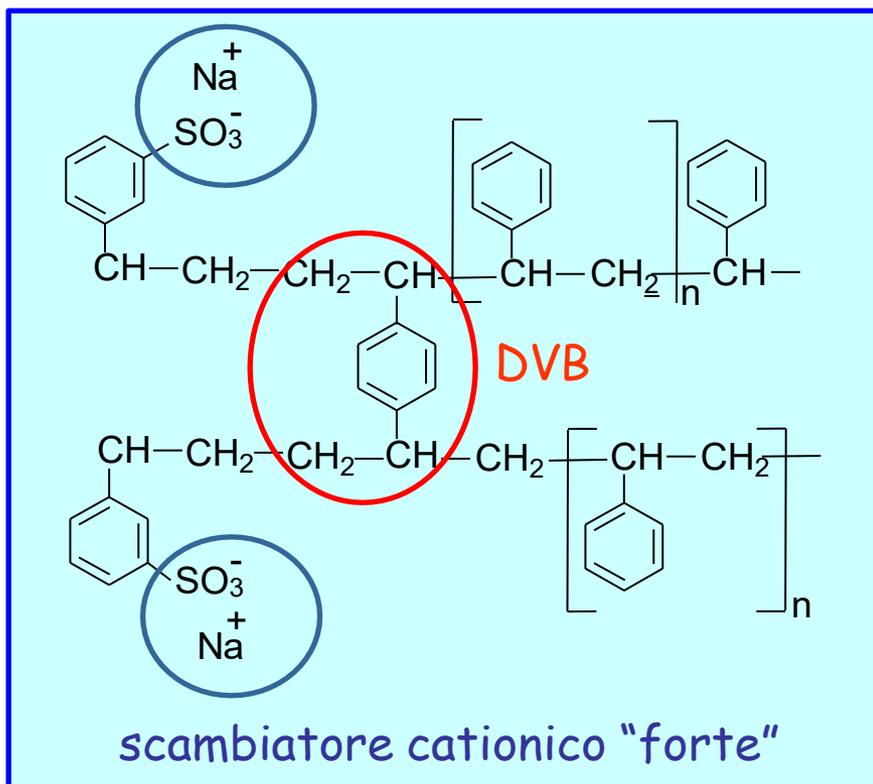


scambio anionico

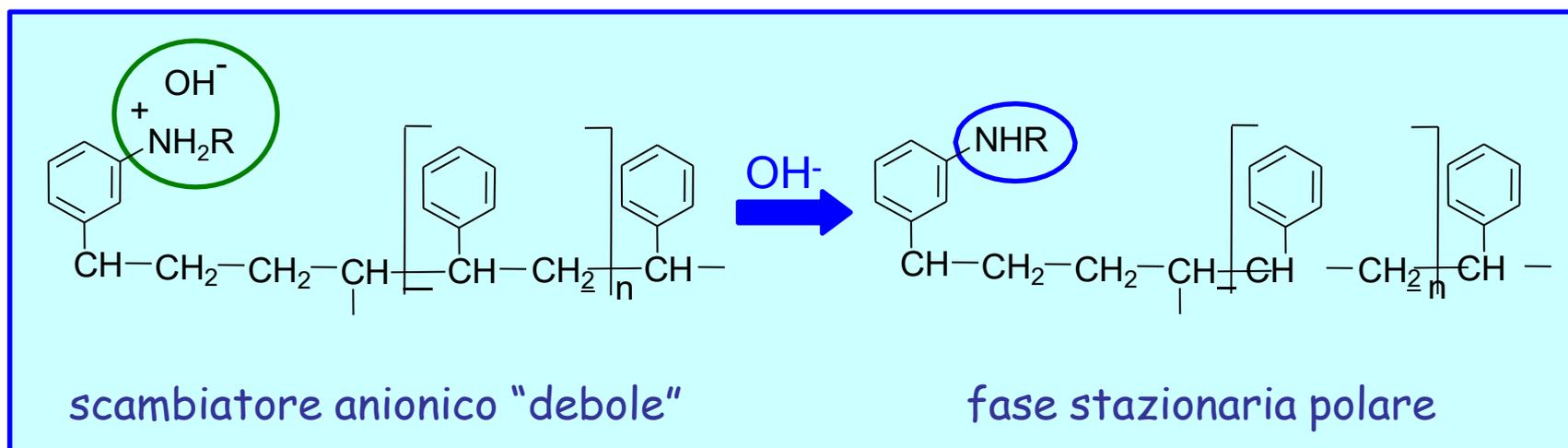
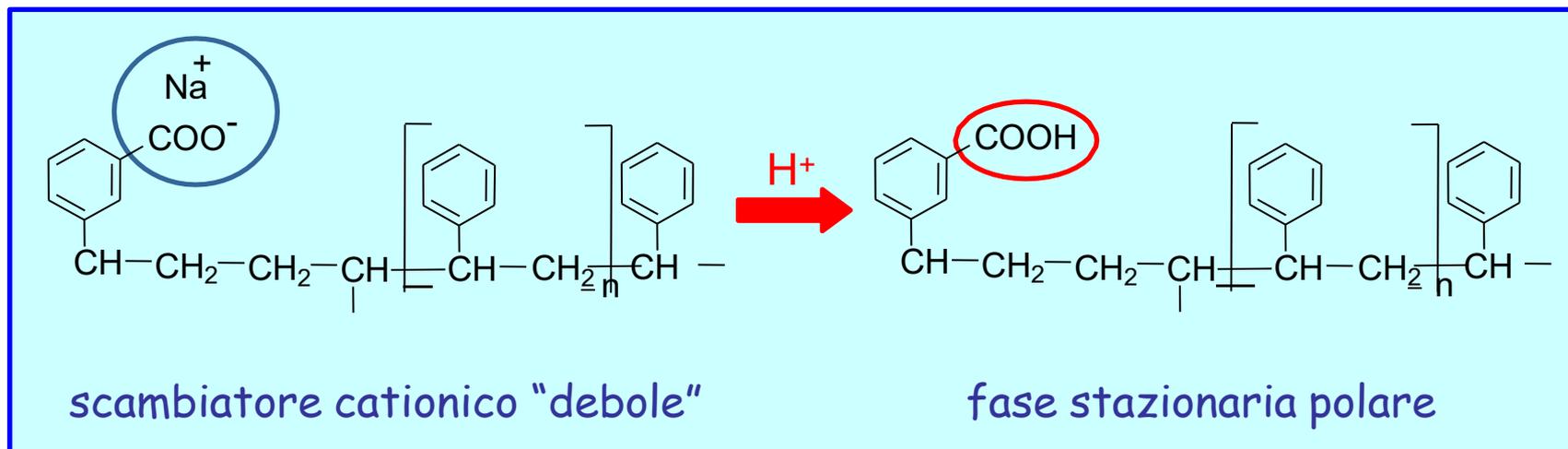


Generalmente le fasi stazionarie sono **copolimeri stirene-divinilbenzene (DVB) modificati con gruppi scambiatori ionici**.

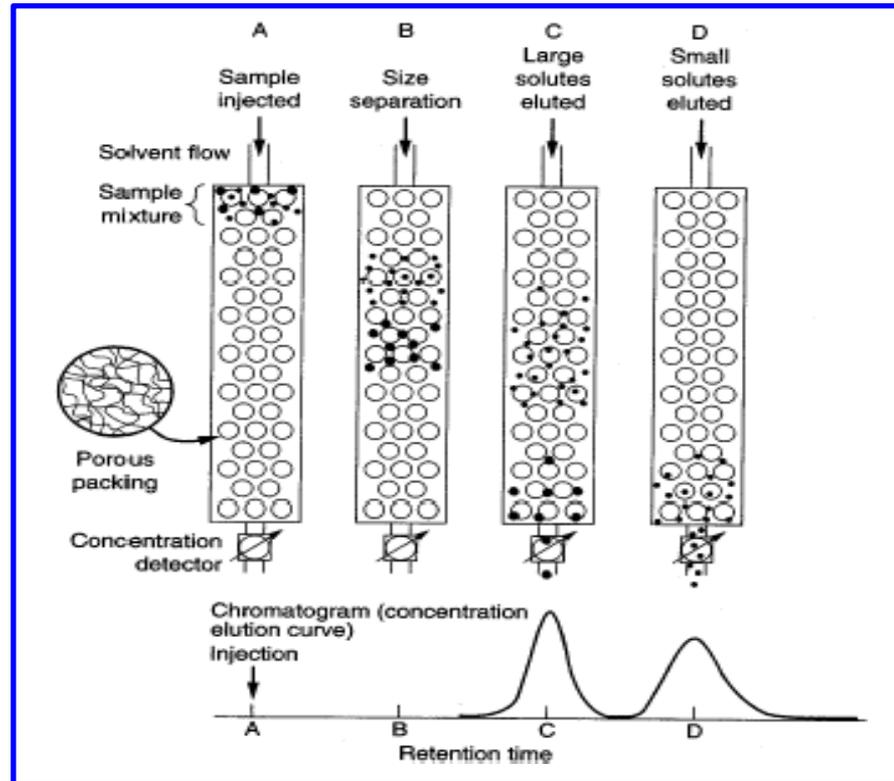
La presenza di DVB (4-12 %) determina il grado di reticolazione (e quindi la rigidità e la porosità) della fase stazionaria.



Gli scambiatori forti possiedono gruppi dotati di carica in qualunque condizione di pH. In alternativa si possono usare scambiatori deboli, ad esempio dotati di gruppi  $\text{COO}^- / ^+\text{NH}_2\text{R}$ , la cui carica può essere soppressa in opportune condizioni di pH (acido/basico rispettivamente).



## Cromatografia di esclusione dimensionale (SEC)

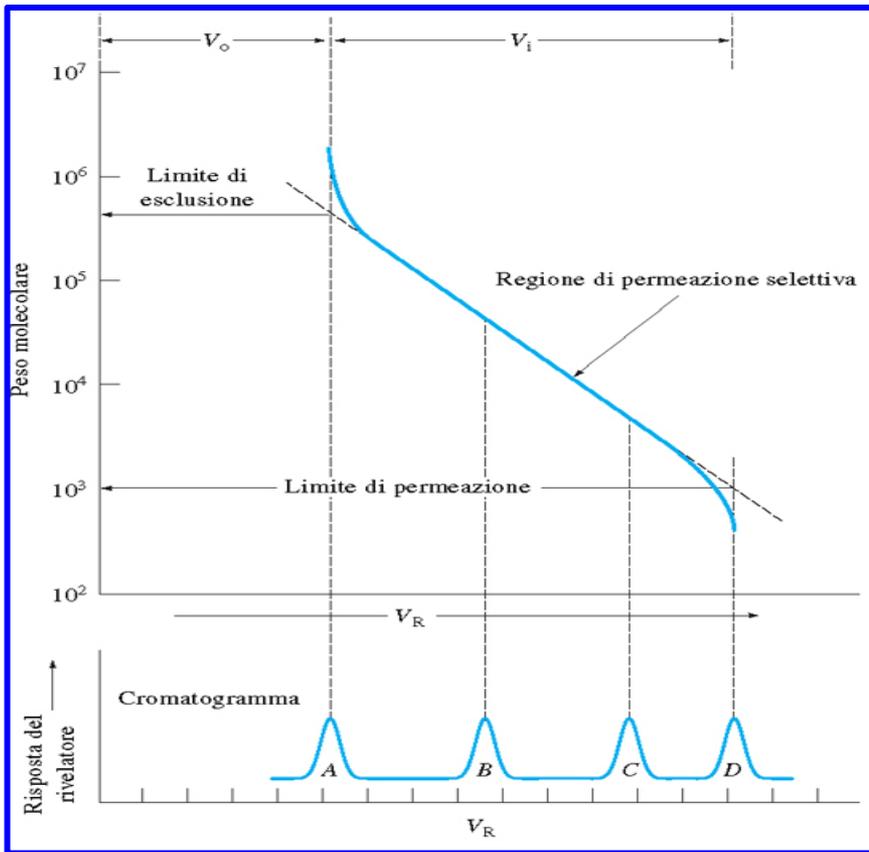


Gli analiti vengono separati in base alle loro dimensioni usando fasi stazionarie costituite da particelle dotate di pori di dimensioni opportune (da 40 a 2500 Å).

Le molecole di grandi dimensioni non riescono a penetrare nei pori e vengono eluite rapidamente, quelle di piccole dimensioni sono ritenute più lungo.

## Parametri di una colonna SEC

- ❖ le molecole le cui dimensioni sono superiori a quelle dei pori (non ritenute) eluiscono nel picco del **volume morto ( $V_0$ )**
- ❖ le molecole di piccole dimensioni eluiscono al volume  $V_0 + V_i$ , con  $V_i$  = **volume interno ai pori**
- ❖ le molecole di dimensioni intermedie eluiscono al volume  $V_R$  =  $V_0 + KV_i$  ( $K < 1$ )



- ❖ **limite di esclusione**: è il peso molecolare oltre il quale non c'è più ritenzione
- ❖ **limite di permeazione**: è il peso molecolare al di sotto del quale non c'è più alcuna differenza nella ritenzione degli analiti

I due limiti per una specifica colonna SEC possono essere stabiliti effettuando una **taratura con analiti di peso molecolare noto**.

## Natura della fase stazionaria e metodi SEC

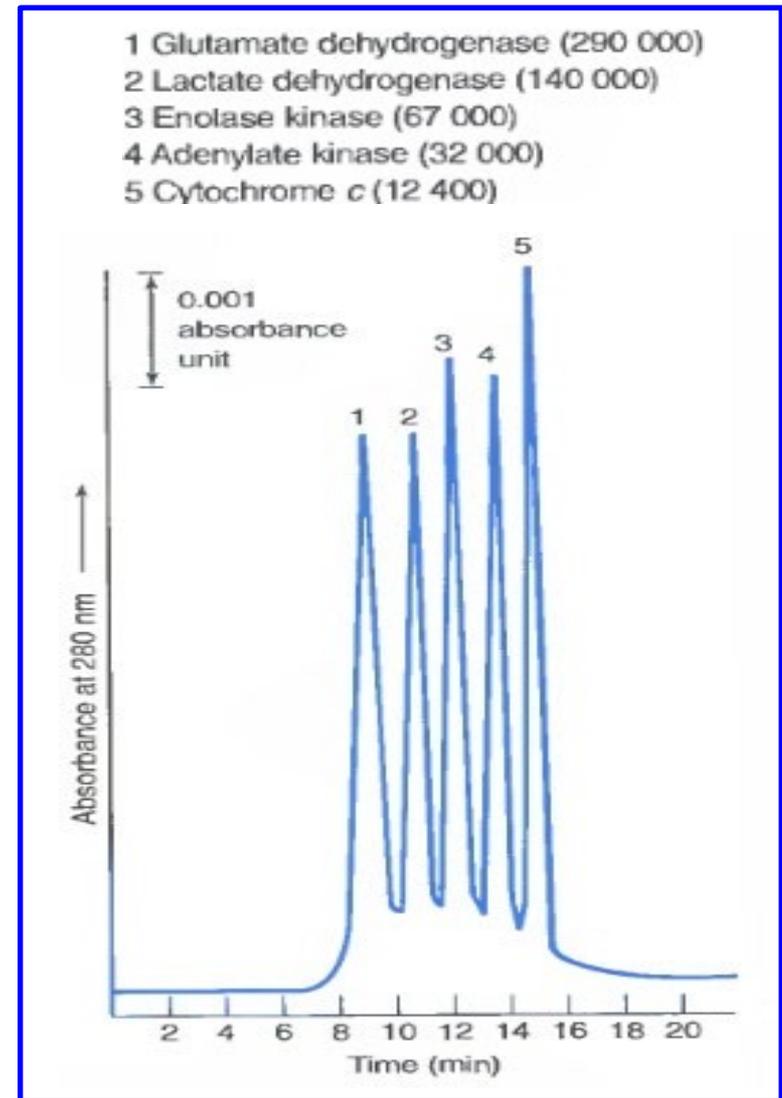
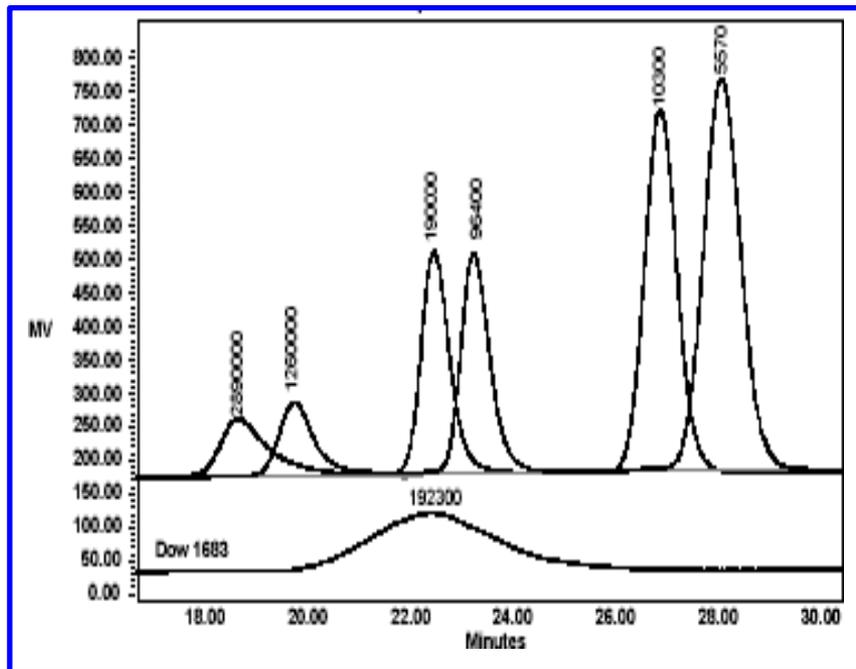
Tipicamente le colonne SEC sono impaccate con particelle (diametro da 5 a 10  $\mu\text{m}$ ) di:

*silice* → SEC a filtrazione su gel, adatta ad analiti solubili in acqua

*copolimeri stirene-divinilbenzene* → SEC a permeazione su gel, adatta ad analiti solubili in solvente organico.

Tipo	Dimensione delle particelle, $\mu\text{m}$	Dimensione media dei pori, $\text{Å}$	Limite di esclusione della massa molecolare*
Polistirene-divinilbenzene	10	100	700
		1000	$(0,1-20) \times 10^4$
		$10^4$	$(1-20) \times 10^4$
		$10^5$	$(1-20) \times 10^5$
Silice	10	$10^6$	$(5->10) \times 10^6$
		125	$(0,2-5) \times 10^4$
		300	$(0,03-1) \times 10^5$
		500	$(0,05-5) \times 10^5$
		1000	$(5-20) \times 10^5$

La cromatografia ad esclusione dimensionale viene impiegata per l'analisi di macromolecole artificiali (**polimeri**) o biologiche (**peptidi, proteine, acidi nucleici**):



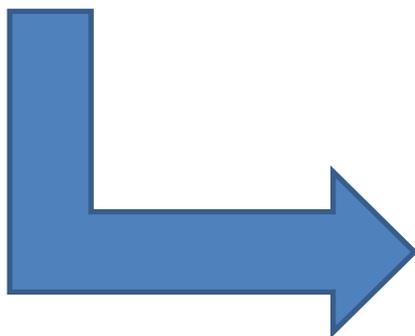
# ***Gas Cromatografia***

- Gas-liquido
  - supporto inerte solido
  - liquido non volatile, legato covalentemente
  - meccanismo di ripartizione
  - moltissime applicazioni
- Gas-solido
  - fasi stazionarie di silice, allumina o carbone
  - meccanismo di adsorbimento
  - adatta per la separazione di gas permanenti ( $H_2$ , He, Ar,  $O_2$ ,  $N_2$ , CO) o idrocarburi a basso punto di ebollizione

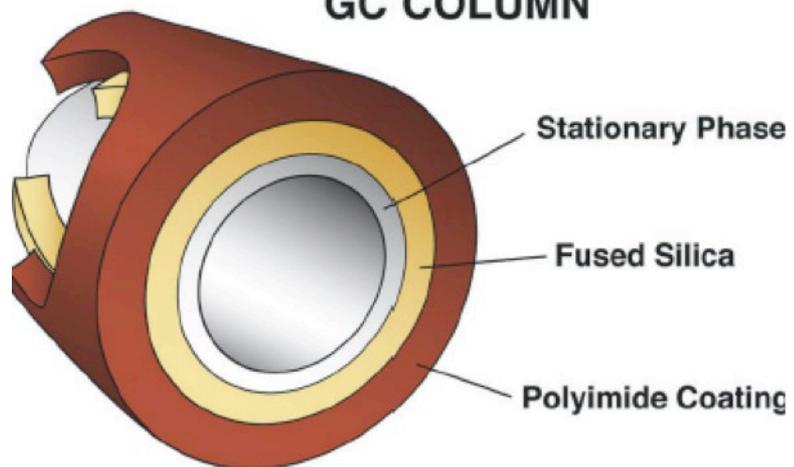
# ***Colonne per gascromatografia***

- Colonne impaccate
  - contengono un supporto solido inerte, finemente suddiviso (comunemente basato su terra di diatomee), ricoperto di fase stazionaria liquida
- Colonne capillari
  - WCOT (Wall Coated Open Tubular), strato sottile di fase liquida (1  $\mu\text{m}$ ) depositato sulla superficie
  - SCOT (Support Coated Open Tubular), strato poroso creato sulle pareti della colonna per trattamento o deposizione chimica
  - PLOT (Porous Layer Open Tubular), strato poroso polimerico o inorganico che funge da fase stazionaria per una cromatografia di adsorbimento

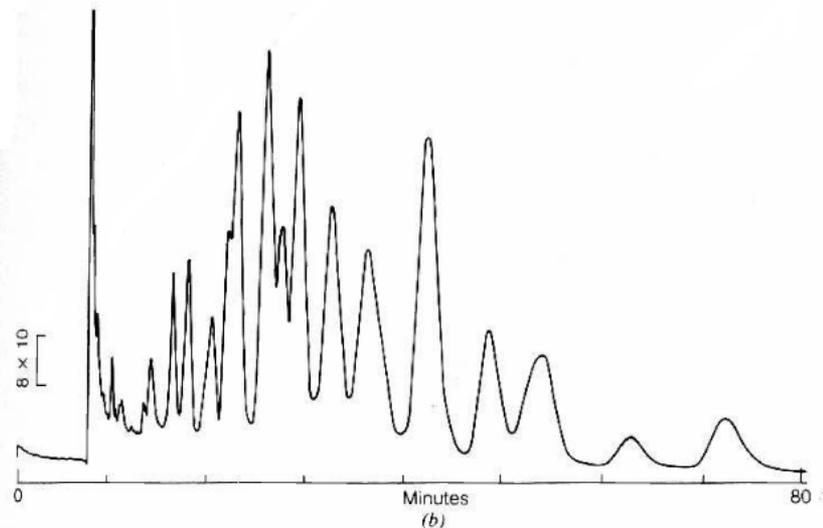
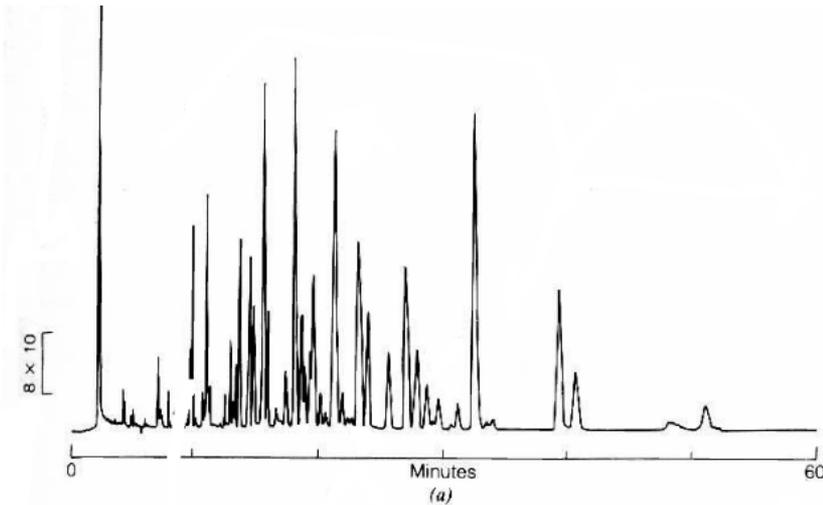
## COLONNE CAPILLARI PER GC



### GC COLUMN

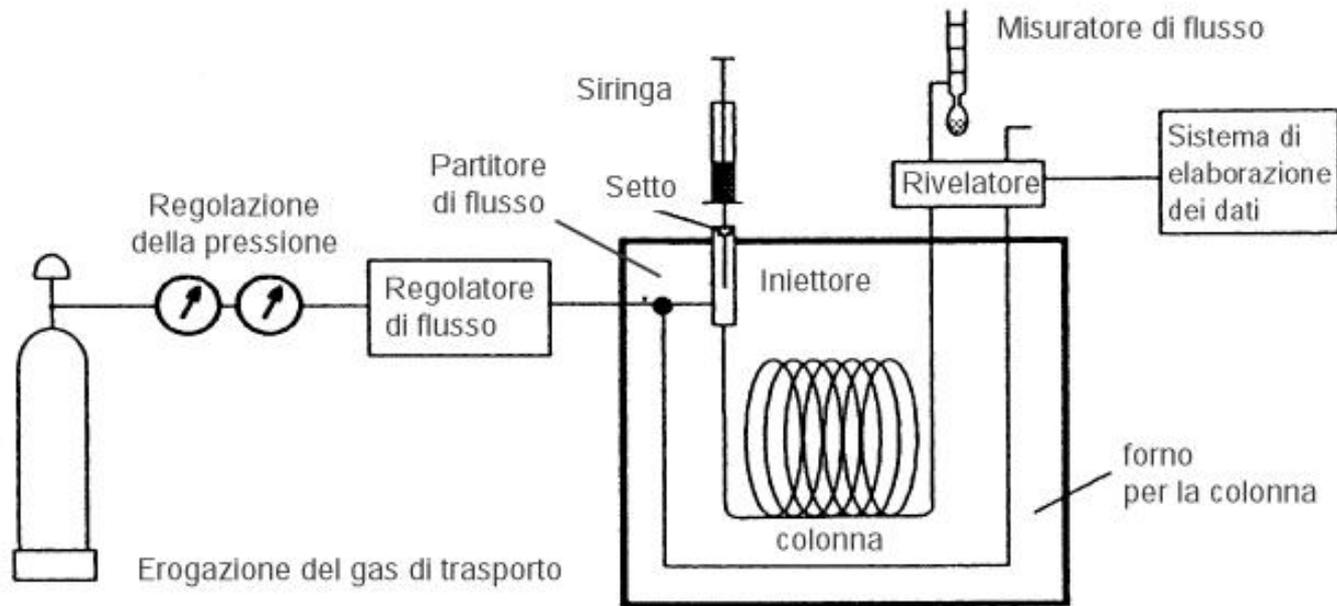


# Confronto tra colonne impaccate e capillari



Le colonne capillari possono essere lunghe fino a 100 m e hanno quindi un numero di piatti teorici enormemente più elevato rispetto alle colonne impaccate. Questa differenza è esemplificata nella figura a lato (in alto separazione con colonna capillare, in basso la stessa separazione con colonna impaccata)

# ***Schema di un GC***



<b>Classificazione generale</b>	<b>Metodo specifico</b>	<b>Fase stazionaria</b>	<b>Tipo di equilibrio</b>
<b>Cromatografia liquida (LC), fase mobile: liquido</b>	Liquido-liquido	Liquido adsorbito su solido	Ripartizione tra liquidi non miscibili
	Liquido, a fase legata	Specie organiche legate a superficie solida	Ripartizione tra liquido e superficie legata
	Liquido-solido	Solido	Adsorbimento
	Scambio ionico	Resina a scambio ionico	Scambio ionico
	Esclusione dimensionale	Liquido in interstizi di solido polimerico	Ripartizione/setacciamento
<b>Gas-cromatografia, Fase mobile: gas</b>	Gas-liquido	Liquido adsorbito su solido	Ripartizione tra gas e liquido
	Gasoso, a fase legata	Specie organiche legate a superficie solida	Ripartizione tra gas e superficie legata
	Gas-solido	solido	Adsorbimento