

# Tecniche cromatografiche

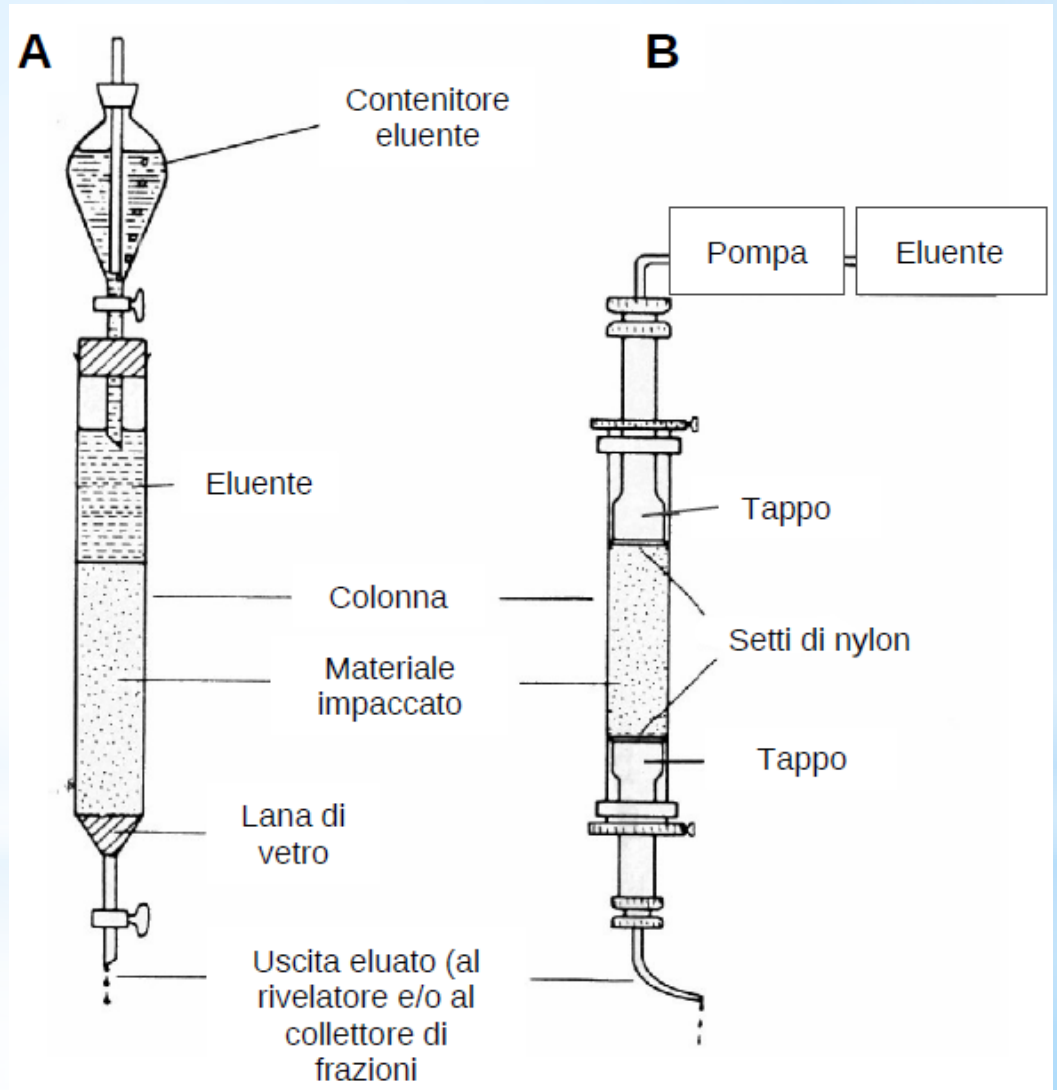
*Al termine della lezione lo studente sarà in grado di:*

- ❖ **Comprendere** i principi generali della cromatografia e le principali tipologie di tecniche cromatografiche.
- ❖ **Conoscere** i parametri che influenzano l'efficienza e la risoluzione di una separazione cromatografica
- ❖ **Apprendere** le caratteristiche e il funzionamento delle principali tecniche cromatografiche (cromatografia su colonna, cromatografia su strato sottile, HPLC)

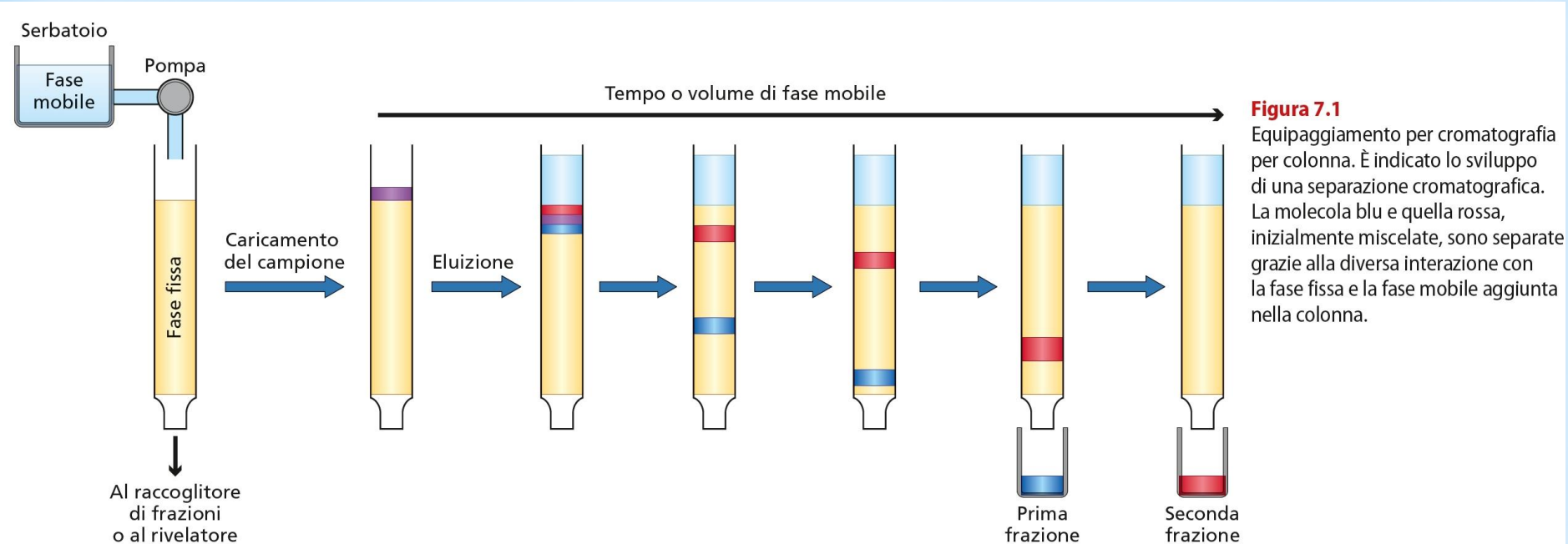
- \* LE TECNICHE CROMATOGRAFICHE sono usate per separare le molecole;
- \* La separazione avviene per ripartizione di un soluto tra due fasi: una **FASE MOBILE (M)** e una **FASE FISSA (FASE STAZIONARIA, S)**;
- \* La fase mobile può essere liquida (**CROMATOGRAFIA LIQUIDA**) o gassosa (**GAS CROMATOGRAFIA**);
- \* La fase fissa può essere solida o liquida;
- \* La separazione può avvenire su diversi supporti: planari (cromatografia su carta o strato sottile) o colonne impaccate con la fase fissa.

# \* PRINCIPI GENERALI

Il flusso della fase mobile entro la colonna può avvenire semplicemente per effetto della **gravità** oppure per azione di una **pompa peristaltica**.



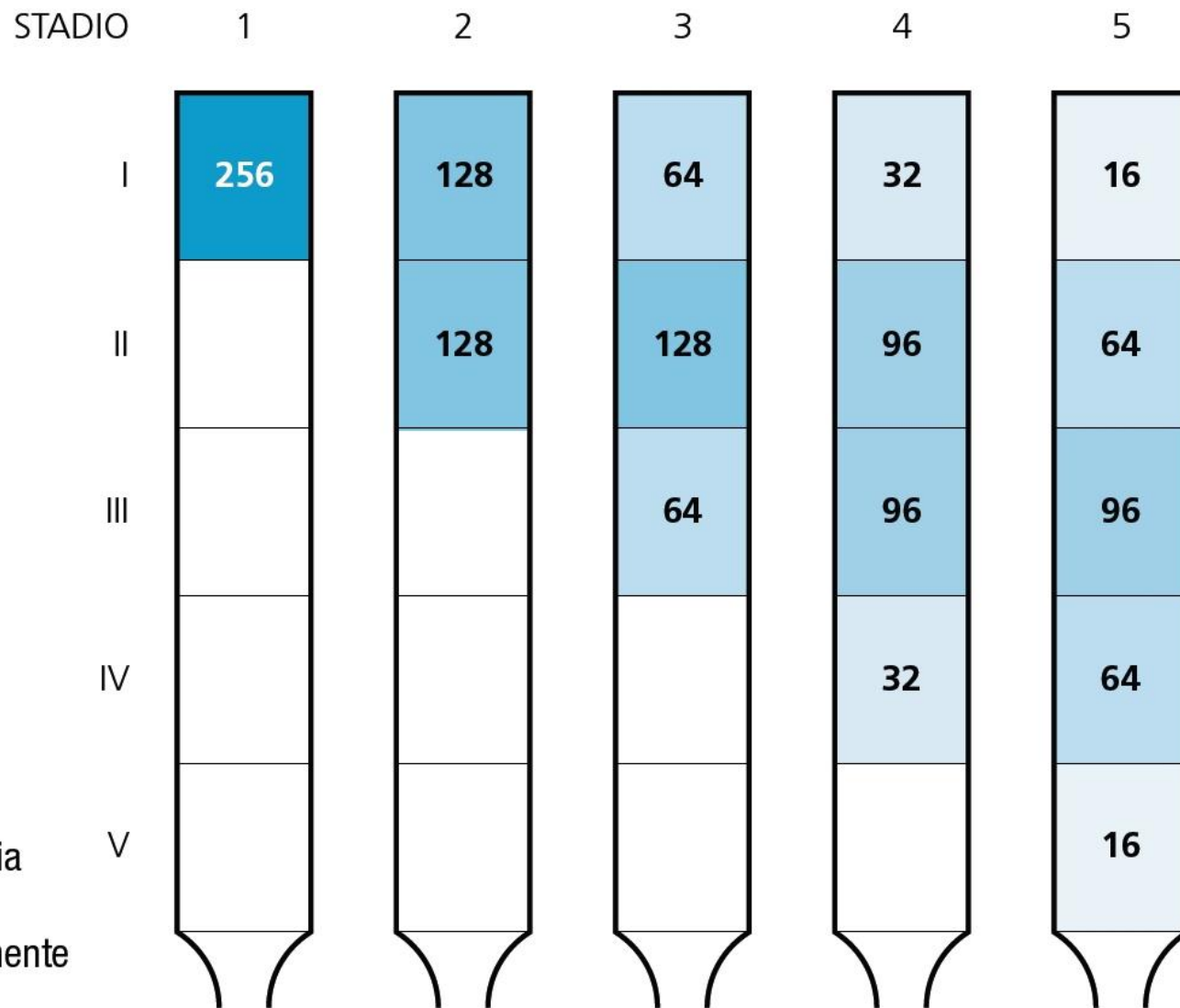
# CROMATOGRAFIA SU COLONNA



La ripartizione di un soluto tra due fasi dipende dalle caratteristiche chimico-fisiche del soluto e delle fasi stesse ed è misurata dal **coefficiente di ripartizione** (o di distribuzione), **Kd**:

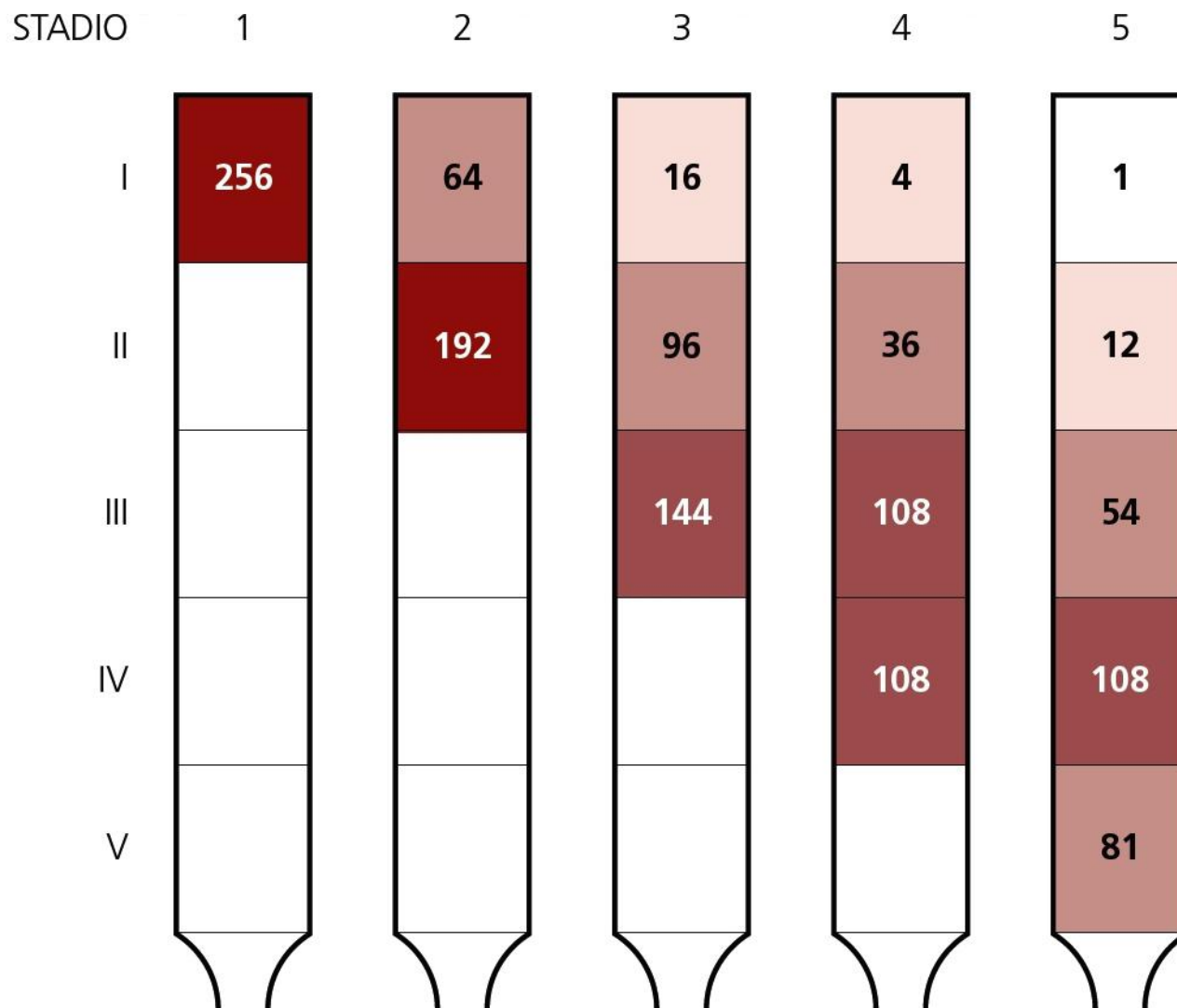
$$\mathbf{Kd = concentrazione\ analita\ nella\ fase\ S / concentrazione\ analita\ nella\ fase\ M}$$

***SOLUTI con Kd differenti si separeranno con formazione di bande cromatografiche distinte che eluiranno in tempi diversi.***



### Figura 5.6

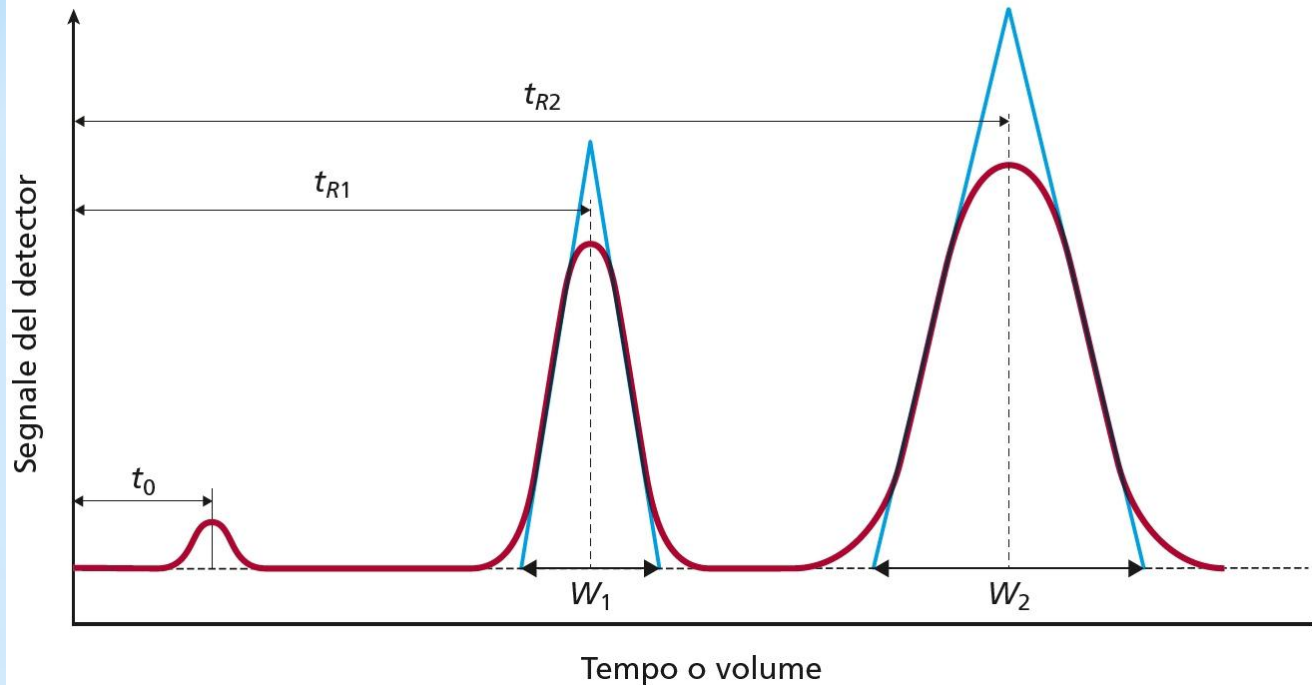
La figura mostra il principio di funzionamento della cromatografia per una sostanza con  $K_r = 1$ . La descrizione è riportata interamente nel testo.



**Figura 5.8**

La figura mostra il principio di funzionamento della cromatografia per una sostanza con  $K_r = 1/3$ . La spiegazione e il confronto con la Figura 5.6 sono riportati nel testo.

# CROMATOGRAMMA



**Figura 7.2**

Schema di un cromatogramma. Sono indicati il tempo morto ( $t_0$ ), i tempi di ritenzione ( $t_R$ ) e la larghezza ( $W$ ) di due picchi cromatografici.

- Le molecole che fuoriescono dalla colonna vengono rivelate da un detector con la rappresentazione di un cromatogramma che mostra i picchi cromatografici;
- **FATTORE DI RITENZIONE,  $k'$** : misura la capacità di un analita di interagire con la colonna cromatografica, dato dal rapporto tra la quantità (in moli) del soluto nella fase S e quella nella fase M e dipende da  $K_d$ :

$$K' = C_s V_s / C_M V_M = K_d V_s / V_M$$

# TEMPO DI RITENZIONE E RISOLUZIONE CROMATOGRAFICA

- ✓ **TEMPO DI RITENZIONE  $t_R$** : punto di maggiore altezza del picco cromatografico; tempo che impiega un componente della miscela iniettata ad uscire dalla colonna o, tecnicamente, ad essere rivelato come picco dal detector
- ✓ **TEMPO MORTO  $t_0$  o  $t_M$** : tempo di eluizione di una sostanza che non interagisce con la fase stazionaria;
- ✓ **VOLUME DI RITENZIONE  $V_R$  E VOLUME VUOTO  $V_0$  (O VOLUME MORTO,  $V_M$ )** dipendono dal flusso della fase stazionaria  $F$  (mL/min):

$$V_R = t_R F$$

$$V_R = V_M + KdV_s$$

**RISOLUZIONE di un PICCO ( $R_s$ )** = capacità di separare o risolvere due o tre picchi tra di loro

Si calcola misurando il rapporto tra la differenza dei rispettivi tempi di ritenzione ( $\Delta t$ ) e la somma dell'ampiezza dei picchi cromatografici ( $W$ ):

$$R_s = 2 \Delta t / W_1 + W_2$$

Dove:

$\Delta t$  = differenza dei  $t_R$  dei soluti 2 e 1 ( $t_{R2} - t_{R1}$ )

$W_1$  e  $W_2$  = ampiezze dei picchi 1 e 2

*La qualità di una separazione cromatografica è tanto maggiore quanto maggiore è la risoluzione.*

$R_s = 1$  separazione completa al 97%

$R_s = 1,5$  separazioni ottimali al 99%

TRE FATTORI CONTRIBUISCONO ALLA RISOLUZIONE CROMATOGRAFICA:

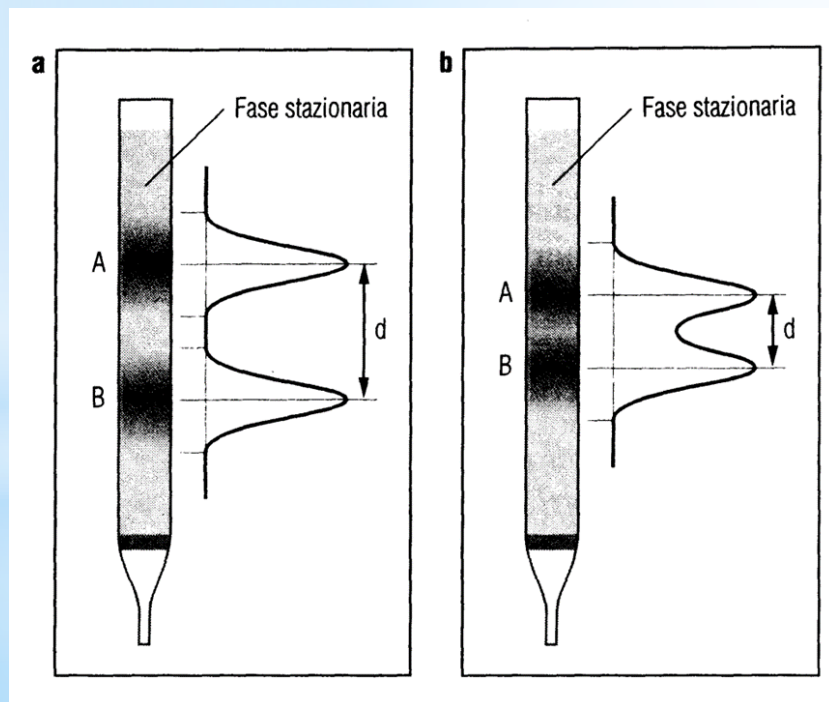
- **SELETTIVITA' (PARAMETRO  $\alpha$ ),**
- **FATTORE DI CAPACITA' (o di ritenzione, parametro  $k'$ )**
- **EFFICIENZA della separazione cromatografica (parametro  $N$ )**

➤ **SELETTIVITA' (PARAMETRO  $\alpha$ ),**

Misura della capacità del sistema cromatografico di discriminare tra due soluti diversi. Dipende dai valori di  $K_d$  delle due sostanze da separare:

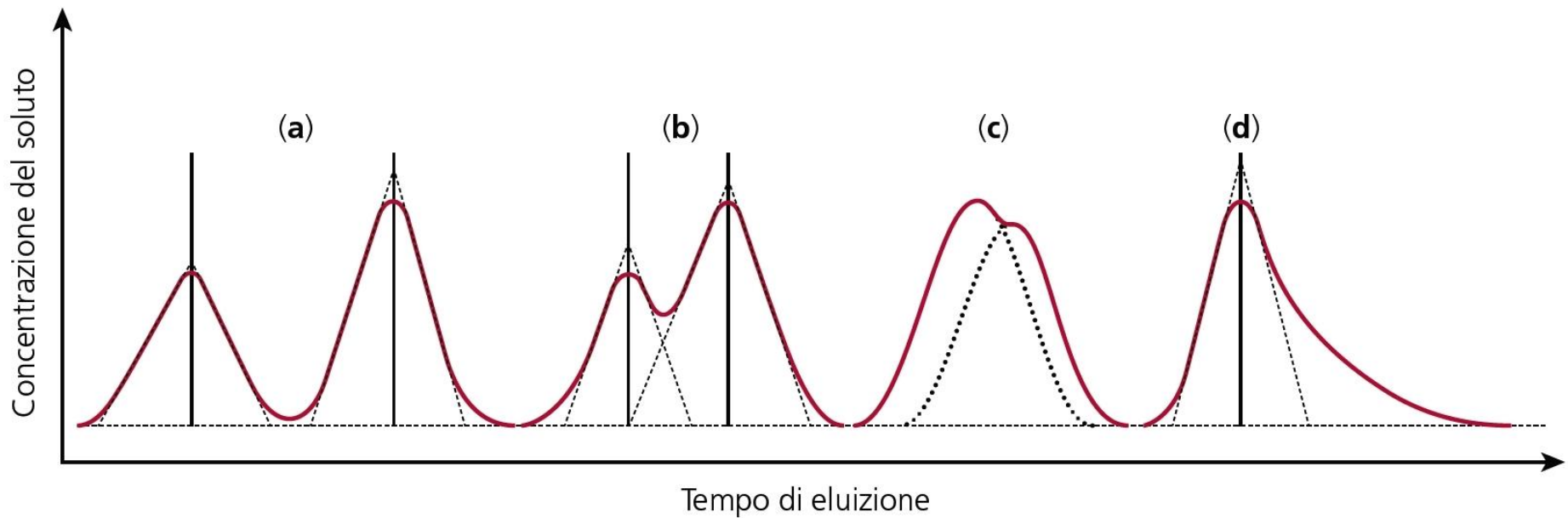
$$\alpha = \frac{t_{R2} - t_0}{t_{R1} - t_0} = \frac{K_{d2}}{K_{d1}}$$

Dipende dalle caratteristiche chimico fisiche della fase stazionaria e della fase mobile



può essere considerato come il rapporto tra i tempi di ritenzione per i 2 analiti:

$$\alpha = \frac{t'_{RA}}{t'_{RB}}$$



**Figura 5.9**

Risoluzione dei picchi di eluzione di una colonna cromatografica. La figura mostra: **(a)** la separazione completa di due molecole; **(b)** una separazione incompleta con sovrapposizione dei due picchi; **(c)** la separazione è talmente scarsa che il picco mostra

una gobba, dovuta alla sovrapposizione quasi completa dei due picchi; **(d)** il picco di eluzione asimmetrico dovuto al fenomeno dello "scodamento" (diffusione della molecola durante la cromatografia).

## ➤ EFFICIENZA della separazione cromatografica (parametro N)

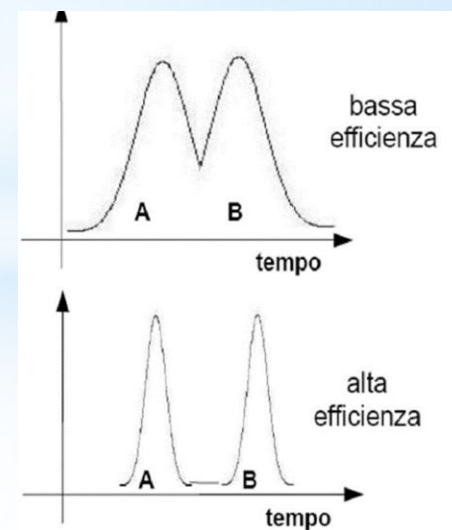
- ❖ Si quantifica con il cosiddetto numero di **piatti teorici (N)**. Un piatto teorico è il più piccolo volume all'interno della colonna in cui il soluto raggiunge un equilibrio tra fase mobile e stazionaria, ossia in cui si instaura l'equilibrio di ripartizione;
- ❖ Il numero di piatti teorici definisce il numero di equilibramenti che avvengono in una colonna;
- ❖ Il numero di piatti teorici condiziona la larghezza del picco di eluizione, ossia l'efficienza della colonna. Più stretti sono i picchi, più efficiente è la colonna.
- ❖ La lunghezza della porzione di colonna corrispondente a un piatto teorico è definita ALTEZZA DEL PIATTO:

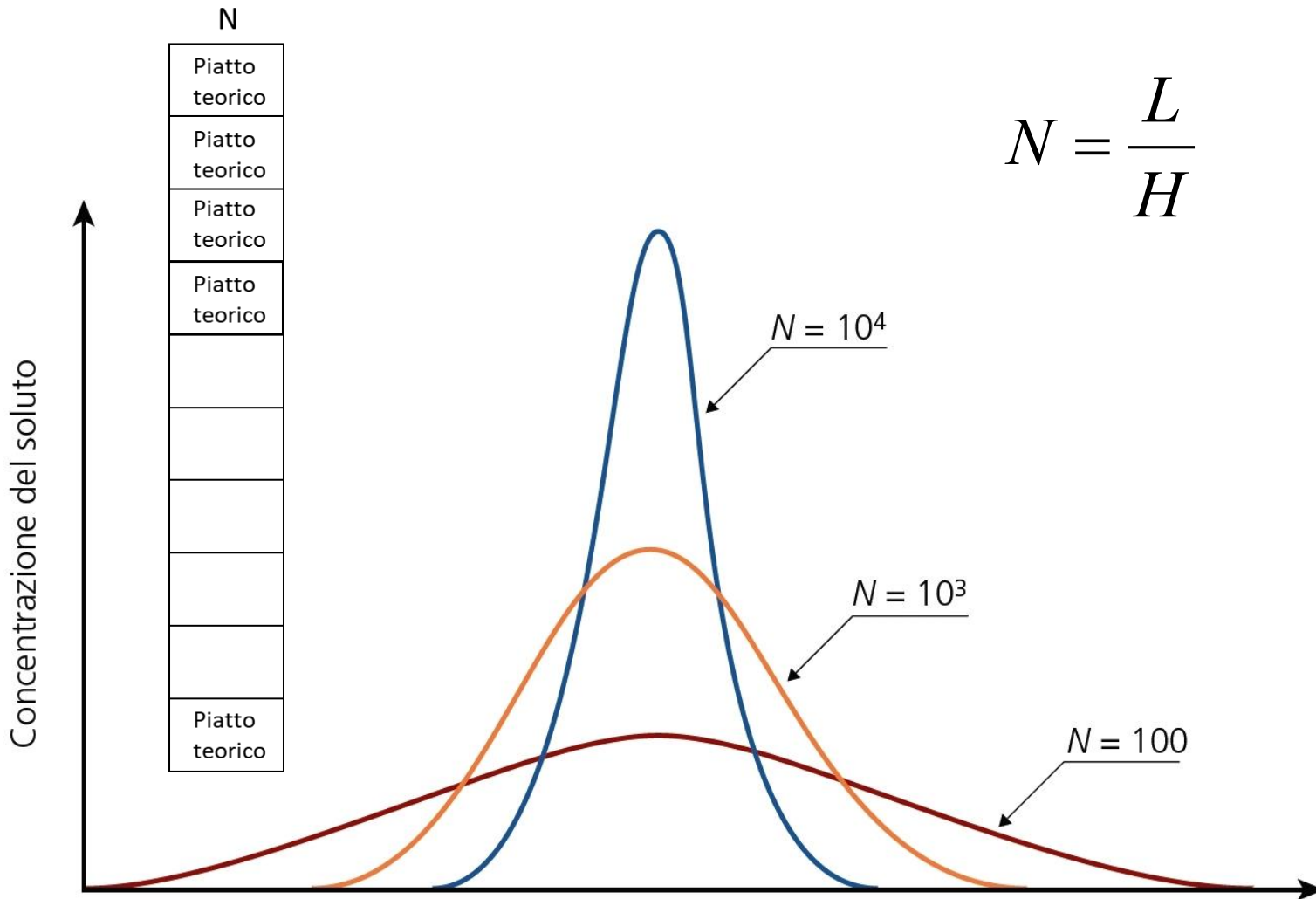
$$HETP = L/N$$

$L$  = lunghezza della colonna

$$N = 16(t_R/W)^2$$

$W$  = larghezza del relativo picco





$$N = \frac{L}{H}$$

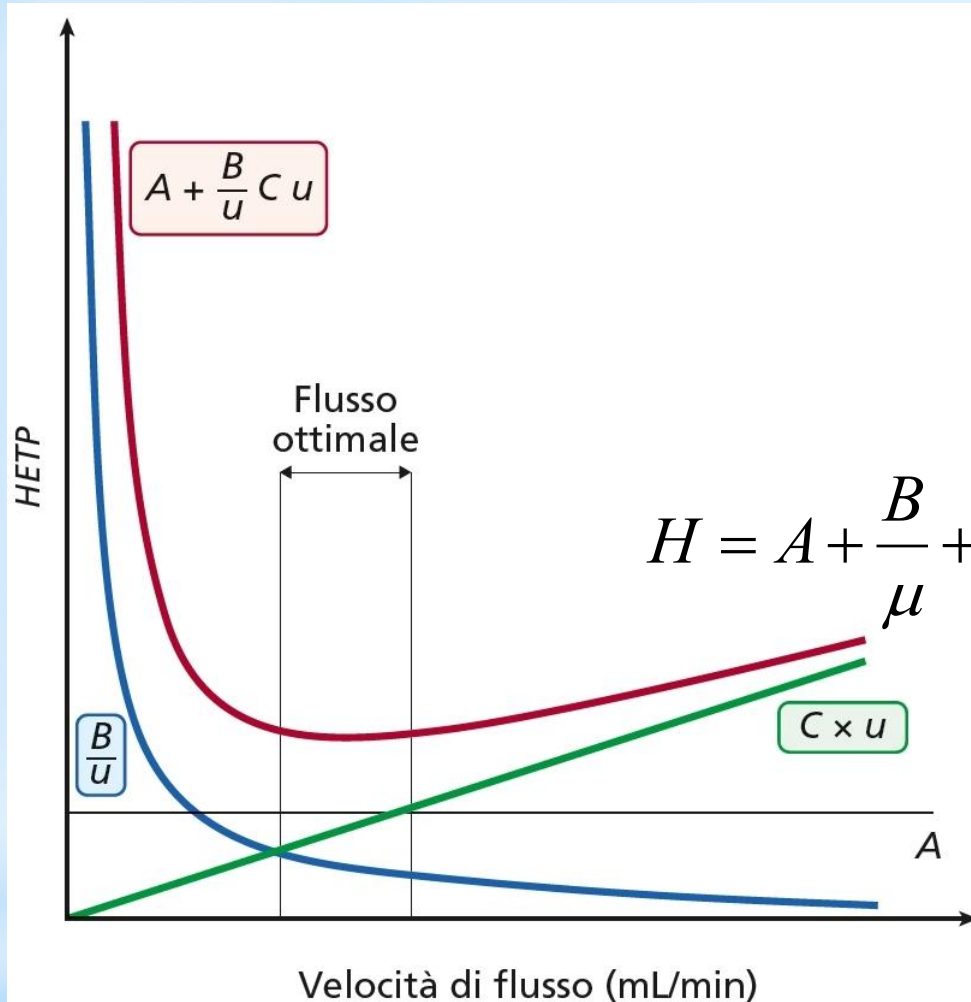
**Figura 5.7**  
 Esempi di distribuzioni diverse di una molecola che è uscita dalla colonna ed è stata raccolta in frazioni. L'efficienza della colonna, ossia la larghezza del picco, dipende, come spiegato nel testo, dal numero di piatti teorici (N).

Distribuzione del soluto nelle frazioni

migliore è una colonna:

- maggiore è il numero di piatti teorici e
- minore l'altezza del piatto teorico.

# RELAZIONE TRA EFFICIENZA CROMATOGRAFICA E FLUSSO DELLA Fm



$$H = A + \frac{B}{u} + C \mu$$

**Figura 7.3**

Rappresentazione grafica della equazione di van Deemter, in cui sono evidenziate separatamente le tre componenti che contribuiscono alla determinazione dell'altezza del piatto teorico (HETP). Con "u" è indicato il flusso della fase mobile nella colonna cromatografica.

## EQUAZIONE DI VAN DEEMTER

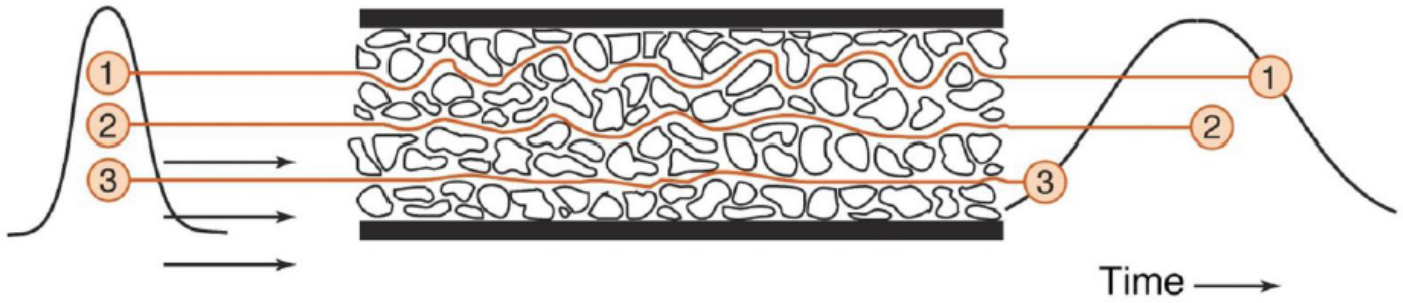
*Minore è il valore di H, maggiore è il numero di piatti teorici contenuti nella colonna e quindi maggiore sarà la sua efficienza.*

- A = diffusione o dispersione vorticososa**
- B = diffusione longitudinale**
- C = resistenza al trasferimento di massa**
- u = velocità lineare della fase mobile**

**A,B,C fenomeni che rallentano il raggiungimento dell'equilibrio**

# EFFICIENZA DI UNA COLONNA: PERCORSI MULTIPLI $H = A + \frac{B}{u} + C_s u$

Le inevitabili differenze dimensioni delle particelle solide che costituiscono la fase stazionaria (o il supporto che la sostiene) fanno procedere le molecole della sostanza in analisi secondo strade diverse (**percorsi multipli**).



**Dalla banda stretta si passa a quella allargata al tempo: delle molecole di soluto vengono eluite prima perché hanno seguito un percorso più breve delle altre!**

Il termine A dell'equazione **Van Deemter** esprime la diffusione vorticososa dovuta ai diversi percorsi seguiti in modo casuale dalle particelle di soluto. L'esistenza di percorsi multipli tende ad allargare la banda (zona di soluto) e l'effetto che ne deriva è indipendente dalla velocità del flusso. Nel loro moto casuale, alcune molecole arriveranno prima, altre dopo, con il risultato globale di far allargare la banda in uscita dalla colonna

La costante A è associata

1. alla granulometria (diametro e distribuzione) e all'impaccamento della colonna, e
2. al diametro medio delle particelle del riempimento.

y

$$y = A$$

# EFFICIENZA DI UNA COLONNA: DIFFUSIONE LONGITUDINALE

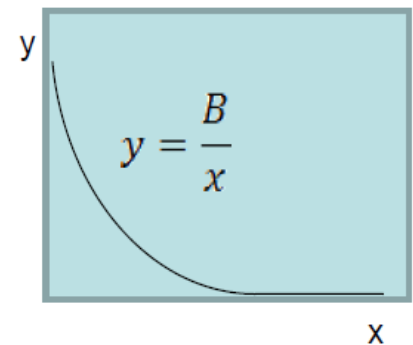
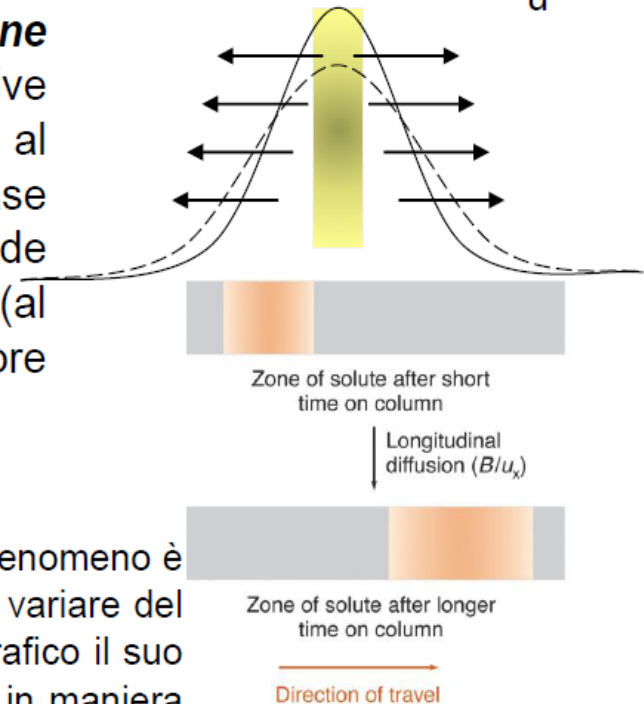
Il termine dipendente dal **coefficiente di diffusione longitudinale** parallela alla direzione del flusso, (**B**) descrive l'allargamento delle bande cromatografiche in seguito al formarsi di gradienti di concentrazione all'interno della fase mobile. Mentre l'analita si trova nella fase mobile, esso diffonde spontaneamente dalle zone a maggiore concentrazione (al centro della banda cromatografica) a quelle a minore concentrazione, determinando l'allargamento della banda.

Nell'equazione di Van Deemter il parametro che rappresenta questo fenomeno è indicato con **B**. Il suo contributo ad H, inversamente proporzionale al variare del flusso (u), è raffigurato con un ramo di iperbole. Come si vede dal grafico il suo contributo all'altezza del piatto teorico cala prima velocemente e poi in maniera più blanda con il crescere del flusso e dipende:

- dall'impaccamento della colonna (vale a dire dalla geometria degli spazi disponibili per la fase mobile)
- dal coefficiente di diffusione dell'analita nella fase mobile,  $D_M$

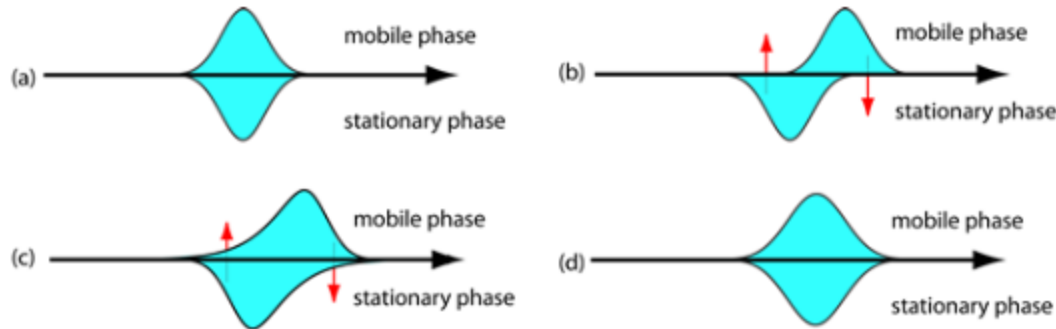
La dipendenza inversa da u è spiegabile considerando che, tanto più u è grande, tanto minore è il tempo trascorso dall'analita in colonna e quindi il processo di diffusione ha meno tempo per verificarsi.

$$H = A + \frac{B}{u} + C_s u$$



### ❖ Effetto del trasferimento di massa sull'ampiezza di picco

Quando il soluto passa attraverso la colonna si muove tra la f.m. e la f.s., questo movimento tra le due fasi è detto trasferimento di massa.



a) Equilibrio ideale con profili Gaussiani del soluto nella f.m. e nella f.s.

b-c) Se la banda del soluto (nella f.m.) si sposta per una breve distanza lungo la colonna non c'è più equilibrio del soluto tra f.m. e f.s.. Le frecce mostrano il movimento del soluto (cioè il trasferimento di massa) tra f.s. e f.m. e viceversa.

d) Una volta che l'equilibrio tra le due fasi è ristabilito la banda del soluto (nella f.m.) risulta più allargata che in precedenza.

Quindi, se il movimento del soluto attraverso la f.m. o la f.s. non avviene a velocità comparabili per mantenere l'equilibrio di partizione tra le due fasi, il picco si allarga.

Mediamente le molecole si muovono più velocemente nella f.m. che nella f.s., quindi per ridurre l'effetto di allargamento di picco dovuto al trasferimento di massa bisogna ridurre la velocità della f.m. per consentire il mantenimento dell'equilibrio di partizione tra le due fasi.



A

risoluzione scarsa



B

buona risoluzione dovuta a buona efficienza

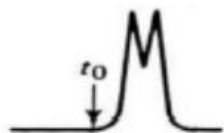
← picchi stretti



C

buona risoluzione dovuta a buona selettività

← picchi distanti



D

risoluzione scarsa dovuta ad un basso fattore di capacità

## ***VARIABILI CHE INFLUENZANO L'EFFICIENZA (la larghezza dei picchi)***

### ***DI UNA COLONNA SONO:***

1. VELOCITA' DI FLUSSO LINEARE (cm/s) DELLA FASE MOBILE
2. ALTEZZA EQUIVALENTE DEL PIATTO TEORICO (H) CHE DIPENDE DALLA VELOCITA' DEL FLUSSO DELLA FASE MOBILE
3. IMPACCAMENTO DELLA COLONNA

## ***VARIABILI CHE INFLUENZANO LA RISOLUZIONE (separazione dei picchi)***

### ***DI UNA COLONNA SONO:***

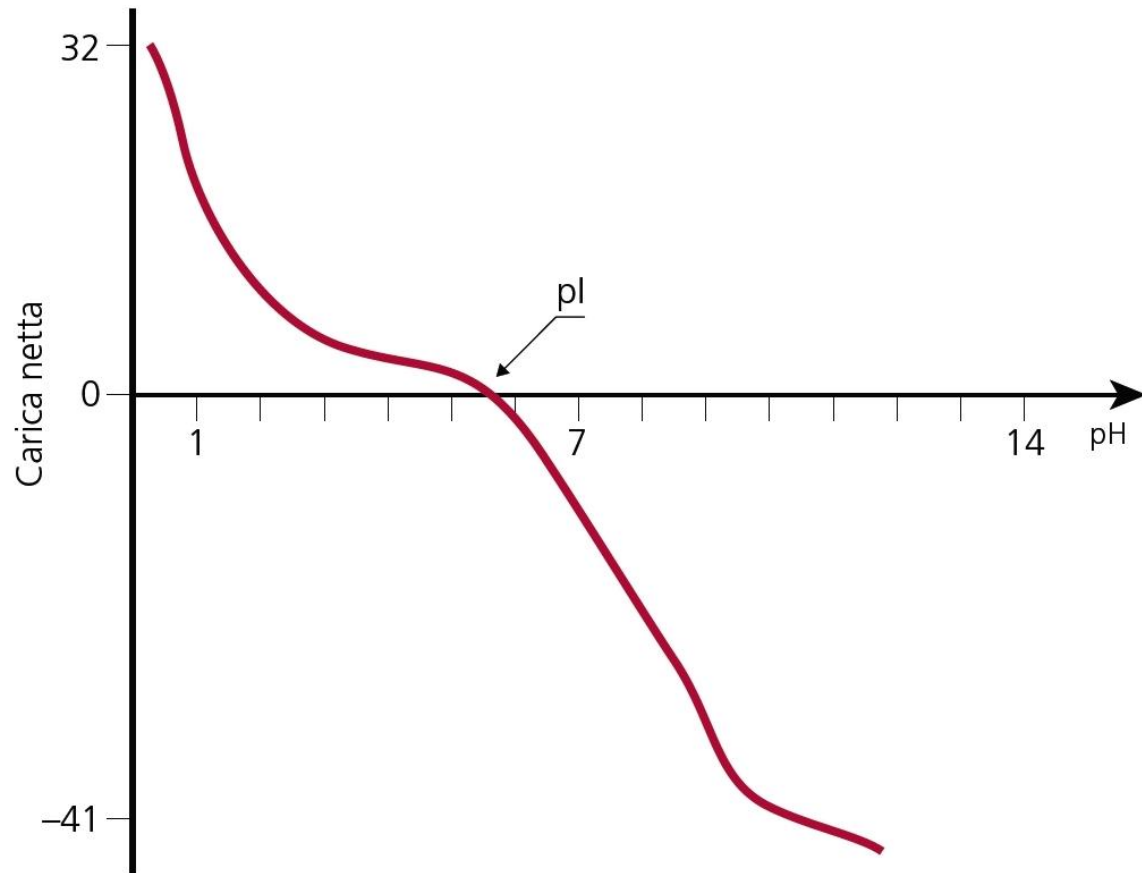
1. SCELTA DELLA FASE STAZIONARIA
2. SCELTA DELLA FASE MOBILE
3. LUNGHEZZA DELLA COLONNA
4. TEMPERATURA

# TIPOLOGIE DI CROMATOGRAFIA SU COLONNA

- ✓ CROMATOGRAFIA A SCAMBIO IONICO
- ✓ CROMATOGRAFIA DI AFFINITA'
- ✓ CROMATOGRAFIA DI ADSORBIMENTO
- ✓ CROMATOGRAFIA DI RIPARTIZIONE
- ✓ CROMATOGRAFIA A ESCLUSIONE MOLECOLARE O GEL-FILTRAZIONE

## ✓ CROMATOGRAFIA A SCAMBIO IONICO

- Si basa sull'attrazione che si verifica tra molecole di cariche di segno opposto. La carica netta che questi composti presentano dipende dal loro punto isoelettrico ( $p_i$ ) e dal pH della soluzione tampone in cui sono disciolti.
- Tale metodo permette di separare le molecole sulla base della **carica netta superficiale**. Le molecole modificheranno il grado di interazione con il mezzo cromatografico in base alla loro carica totale, alla densità di carica e alla distribuzione della loro carica.



**Figure 5.15**

Curva di titolazione di una generica proteina avente un punto isoelettrico (pI) pari a 5,5. Dal grafico è facile individuare come per valori di pH inferiori al pI della proteina, essa assume carica positiva, e viceversa.

## Le separazioni per scambio ionico sono condotte in colonne impaccate con una resina scambiatrice di ioni

Esistono due tipi di resine:

➤ **Scambiatori cationici:** possiedono gruppi carichi negativamente e attraggono molecole cariche positivamente (i cationi); sono anche chiamati materiali acidi a scambio ionico, perché le loro cariche negative risultano dalla ionizzazione di gruppi acidi.

➤ **Scambiatori anionici:** possiedono gruppi carichi positivamente e attraggono pertanto molecole cariche negativamente (gli anioni). Sono anche chiamati materiali basici a scambio ionico, perché le loro cariche positive risultano generalmente dall'associazione di protoni con gruppi basici.

- ❖ **Scambiatori forti**, mantengono la loro carica anche per valori di pH estremi,
  - ❖ **scambiatori deboli**, presentano una carica in un intervallo di pH più ristretto.
- 
- ✓ Gli scambiatori sono legati covalentemente a matrici solide inerti. Queste resine scambiatrici di ioni sono formate da polimeri insolubili uniti tra loro da legami intrecciati, che formano una matrice più o meno intricata. Le particelle da cui sono formate queste resine possono essere di diverse dimensioni, dette *mesh*.
  - ✓ Il *mesh* indica le dimensioni del setaccio molecolare: maggiore è il numero di *mesh*, più piccole sono le particelle che compongono la matrice.

Le resine possono essere porose o non porose, ma devono:

- Essere fisicamente stabili;
- Essere chimicamente resistenti anche a condizioni stringenti di lavaggio;
- Avere bassi livelli di interazione non specifica;
- Essere modificabili per diventare specifiche;

**Tabella 7.1** Principali resine a scambio ionico utilizzate nella IEC, loro gruppi funzionali e relativi intervalli di pH nei quali la carica risulta stabile.

Scambiatore	Tipologia	Gruppi funzionali	Intervallo di pH	Matrici	Resine commerciali
Solfonico: sulfopropilico (SP) Metil-sulfonato (MS)	Cationico forte	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{SO}_3^-$ $-\text{CH}_3-\text{SO}_3^-$	4-13	Agarosio Destrano Agarosio	SP-Sepharose® SP-Sephadex® Capto® S
Carbossi-metile (CM)	Cationico debole	$-\text{CH}_2-\text{COO}^-$	6-10	Agarosio Destrano Cellulosa	CM-Sepharose® CM-Sephadex® CM-Cellulosa
Ammonio quaternario (trimetil-amminometile - Q) Amminoetile quaternario (QAE)	Anionico forte	$-\text{O}-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$	2-12	Agarosio Agarosio Polistirene Destrano	Q-Sepharose® Capto® Q Dowex® 1x2 QAE-Sephadex®
Amminoetile (AE) Diethyl-amminoetile (DEAE)	Anionico debole	$-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_3^+$ $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}^+(\text{CH}_2-\text{CH}_3)_2$	2-9	Agarosio Cellulosa Destrano	DEAE-Sepharose® DEAE-Sephacel® DEAE-Sephadex®

La **risoluzione** dipende:

- Dalle proprietà della matrice;
- Dalle condizioni di eluizione;
- Dalle condizioni di impaccamento della colonna;
- Dal flusso della fase mobile .

L'**efficienza** dipende:

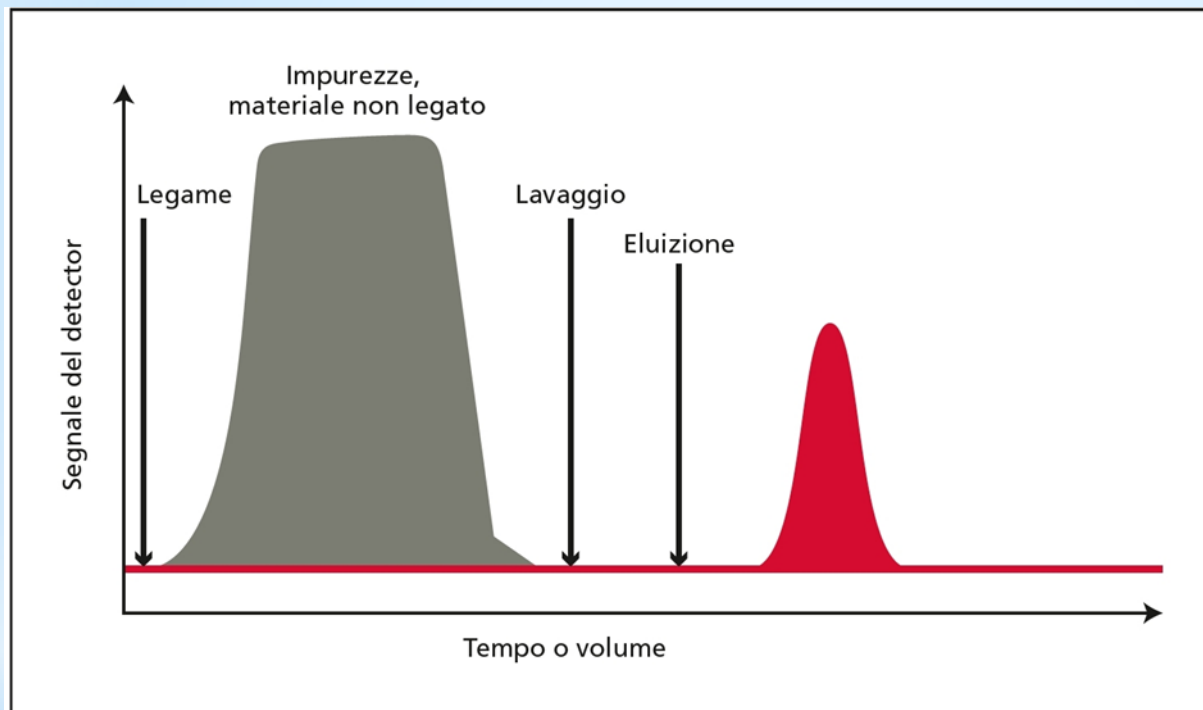
- Dalla diffusione longitudinale, che a sua volta dipende dall'impaccamento della colonna, e dalla presenza di bolle;
- Dal tipo di resina utilizzata: più piccole sono le dimensioni delle particelle, migliore sarà la dimensione del picco.

La **selettività** dipende:

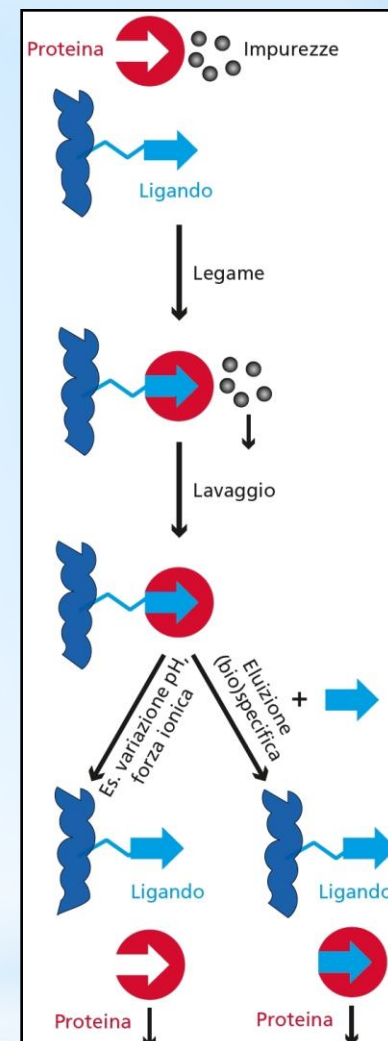
- Dalla natura e dal numero di gruppi funzionali presenti sulla matrice;
- Dalle condizioni sperimentali come il pH e dalla forza ionica;
- Dalle condizioni di eluizione

## ✓ CROMATOGRAFIA DI AFFINITA'

- La cromatografia di affinità, a differenza degli altri tipi di cromatografia, non si basa sulle differenze nelle proprietà chimico-fisiche delle molecole da separare, ma sfrutta le interazioni altamente specifiche che si possono instaurare tra le macromolecole biologiche;
- Permette di separare proteine sulla base di un **legame reversibile** (interazioni di natura elettrostatica o idrofobica, forze di Van der Waals o ponti idrogeno) tra una proteina e uno specifico ligando agganciato alla matrice cromatografica;
- la tecnica è caratterizzata da alta selettività, alta risoluzione e alta capacità, permettendo di raggiungere una purificazione completa in una singola tappa, anche partendo da miscele complesse.



**Figura 7.6**  
Cromatogramma relativo alla separazione cromatografica rappresentata in Figura 7.5.



**Figura 7.5**  
Vari passaggi della cromatografia di affinità. Le proteine e altre impurezze che non si legano alla resina vengono eluite immediatamente. Dopo un lavaggio, l'applicazione di una fase mobile idonea consente l'eluizione della proteina da purificare.

Il ligando utilizzato, che di solito è legato ad un braccio spaziatore per renderlo più accessibile alla macromolecola, deve avere le seguenti caratteristiche:

- ❖ Il gruppo chimico da legare alla matrice o al braccio spaziatore non deve essere coinvolto nel legame con la macromolecola da purificare;
- ❖ Deve essere attaccato alla matrice in modo da non interferire con la capacità di legare la macromolecola;
- ❖ Il braccio spaziatore tra ligando e matrice deve avere una lunghezza di 6-10 atomi di carbonio.

La matrice ideale da utilizzare nella cromatografia di affinità deve possedere le seguenti caratteristiche:

- ❖ Deve contenere numerosi gruppi reattivi adatti a legare covalentemente il ligando e deve risultare stabile nelle condizioni in cui avviene tale attacco;
- ❖ Deve essere stabile nelle condizioni di interazione della macromolecola e nella successiva eluizione;
- ❖ Non deve interagire, se non debolmente, con altre macromolecole, per evitare un adsorbimento aspecifico;
- ❖ Deve possedere buone capacità di flusso .

# Cromatografia di adsorbimento

- Si basa sulla capacità di alcuni materiali solidi di adsorbire (legare tramite interazioni deboli, quali forze di Van der Waals e legami idrogeno) le molecole sulla loro superficie;
- Sulla superficie dei granuli si trovano **siti attivi** che possono stabilire legami deboli (reversibili!) con le molecole della miscela da separare;
- Le molecole che si vogliono separare si legano alla fase stazionaria solida e devono essere eluite utilizzando una fase mobile diversa da quella usata per l'equilibratura della colonna;
- Può essere **gas-solido o liquido-solido** a seconda della natura della fase mobile ed è indicata per separare molecole con polarità diversa.

I siti di adsorbimento possono essere occupati dall'eluente o dall'analita. Un tipico adsorbente è la silice, che è leggermente acida e può interagire con gruppi polari dell'analita o dell'eluente. Le proprietà di separazione dipendono dalla disposizione dei gruppi di silanolo. Altre resine utilizzate sono l'allumina (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) e il carbone.

**Tabella 3-2:** Gruppi funzionali interessati dalla cromatografia di adsorbimento in ordine di polarità crescente.

Gruppo funzionale	Struttura
Metile	- CH <sub>3</sub>
Fluoro	- F
Cloro	- Cl
Nitro	- NO <sub>2</sub>
Aldeide	- CHO
Acetile	- O - C(=O) - CH <sub>3</sub>
Ossidrile	- OH
Chetone	- C(=O) -
Ammina	- NH <sub>2</sub>
Carbossile	- COOH
Ammide	- NH - C(=O) -

I gruppi legati alla silice che più frequentemente vengono utilizzati sono:

ottadecil - CCCCCCCCCCCCCCCCCC

ottil - CCCCC

etil - CC

fenil - c1ccccc1

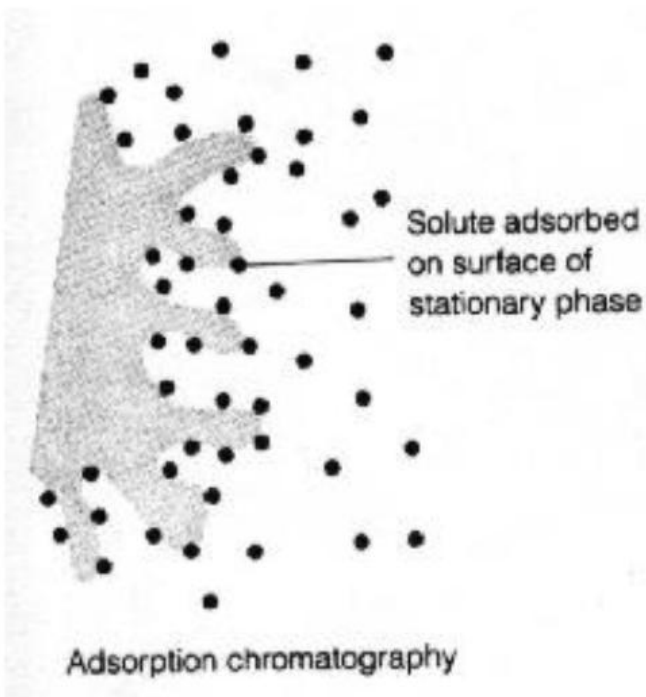
cianoetil - CC#N

idrossietil - CCO

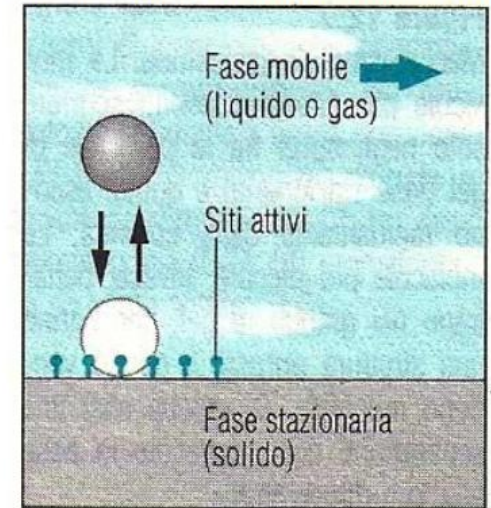
amminoetil - CCN

} A FASE DIRETTA

**POLARITA'**



Fonte: Analisi chimica strumentale, Ed. Zanichelli, 2000



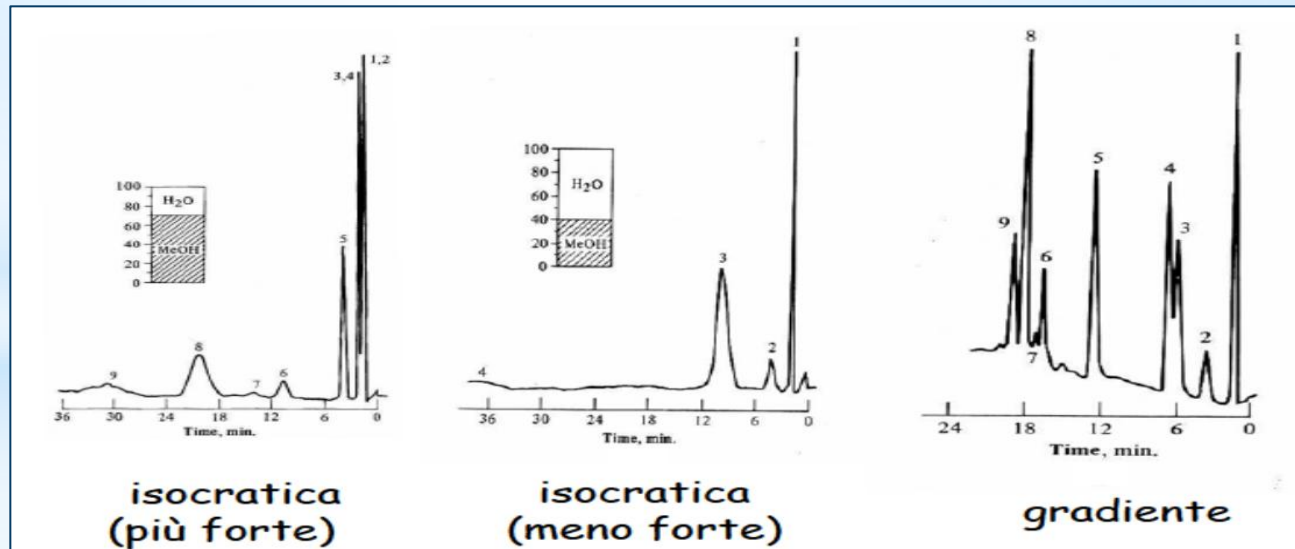
## Interazioni idrofobiche

La cromatografia di adsorbimento è utilizzata per separare sostanze neutre polari o non polari, di natura organica o inorganica.

## SCelta DEL SOLVENTE DI ELUZIONE (FASE MOBILE):

- Alcoli: se la miscela contiene analiti con gruppi ossidrilici;
- Acetone o esteri: se gli analiti presentano gruppi carbonilici;
- Idrocarburi come esano, eptano e toluene per analiti non polari.

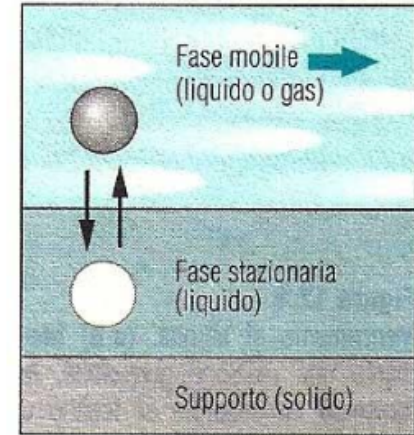
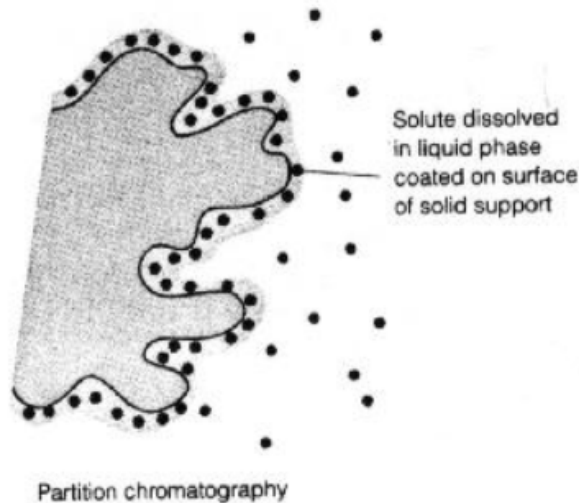
L'eluizione può essere isocratica, cioè a concentrazione costante, oppure essere in gradiente.



## ✓ CROMATOGRAFIA DI RIPARTIZIONE

- Si basa sulla distribuzione di un soluto tra due fasi liquide delle quali una è adsorbita sulla fase stazionaria (cromatografia liquida/liquida)
- Es cromatografia su carta: la fase stazionaria costituita da acqua è adsorbita su un supporto cellulosico;
- Gli analiti saranno separati tra di loro grazie ai diversi valori di  $K_d$  e in base al fattore di capacità  $K'$

Durante l'eluizione le molecole si ripartiscono dinamicamente tra le due fasi in base al coefficiente di ripartizione dei soluti nelle 2 fasi: si parla quindi di ***cromatografia di ripartizione (gas-liquido o liquido-liquido)***.



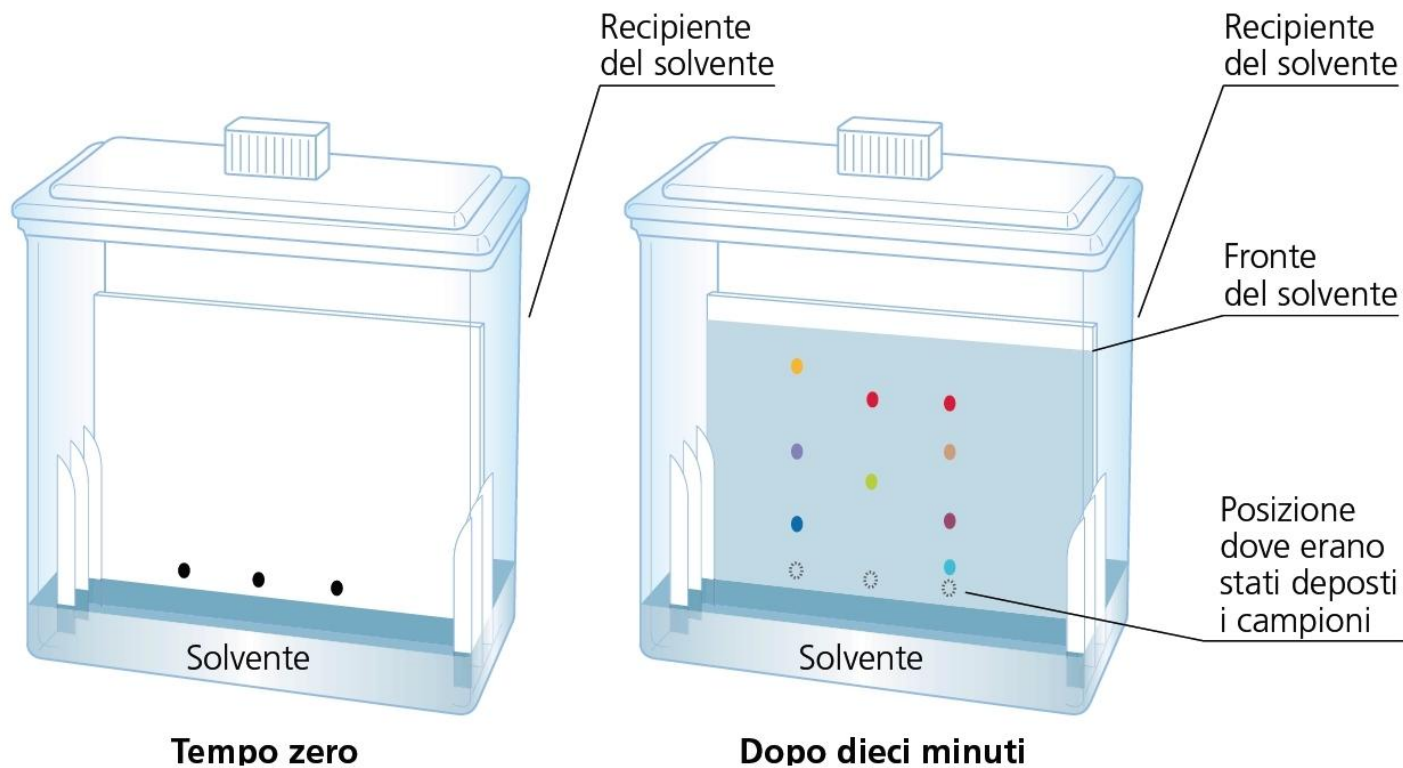
Fonte: Analisi chimica strumentale, Ed. Zanichelli, 2000

Due tipi:

- ***fase normale***, fase stazionaria è più polare (es. acqua) della fase mobile;
- ***fase inversa***, fase stazionaria è meno polare (apolare) della fase mobile. Si tratta della tecnica più comunemente impiegata per la separazione di sostanze organiche

## CROMATOGRAFIA SU STRATO SOTTILE

- In questo tipo di cromatografia la fase stazionaria è costituita da un sottile strato di adsorbente che viene mescolato con un opportuno legante quale ad es. gesso, che ha lo scopo di conferire al materiale adsorbente particolare compattezza.
- La fase stazionaria viene fatta aderire su di una lastra di vetro, di alluminio o di poliestere.
- La lastra viene immersa nell'eluente (dopo caricamento del campione) che salirà per capillarità.

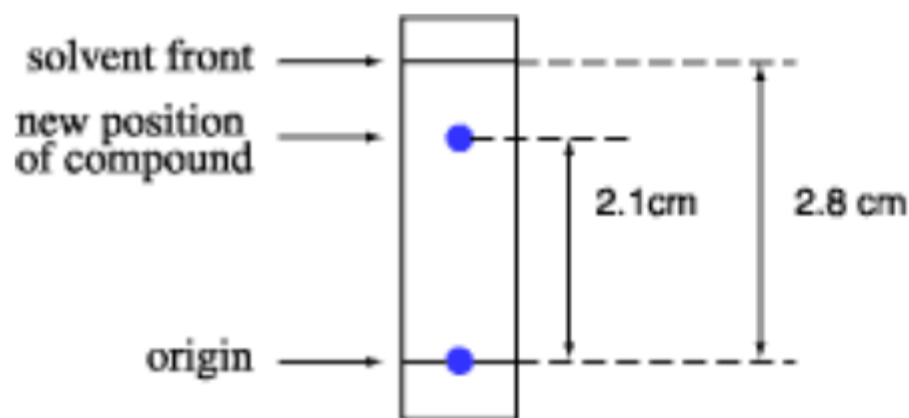


**Figura 5.20**

Cromatografia su strato sottile (TLC). I campioni sono depositati all'estremità di una lastrina di silice o cellulosa spalmata su alluminio (o vetro), posta in un recipiente contenente un solvente (pannello sinistro), che per capillarità sale lungo la lastrina; le varie molecole sono separate in base al loro diverso coefficiente di ripartizione che ne determina la velocità di migrazione nel solvente (pannello destro).

# IL FATTORE DI RITENZIONE

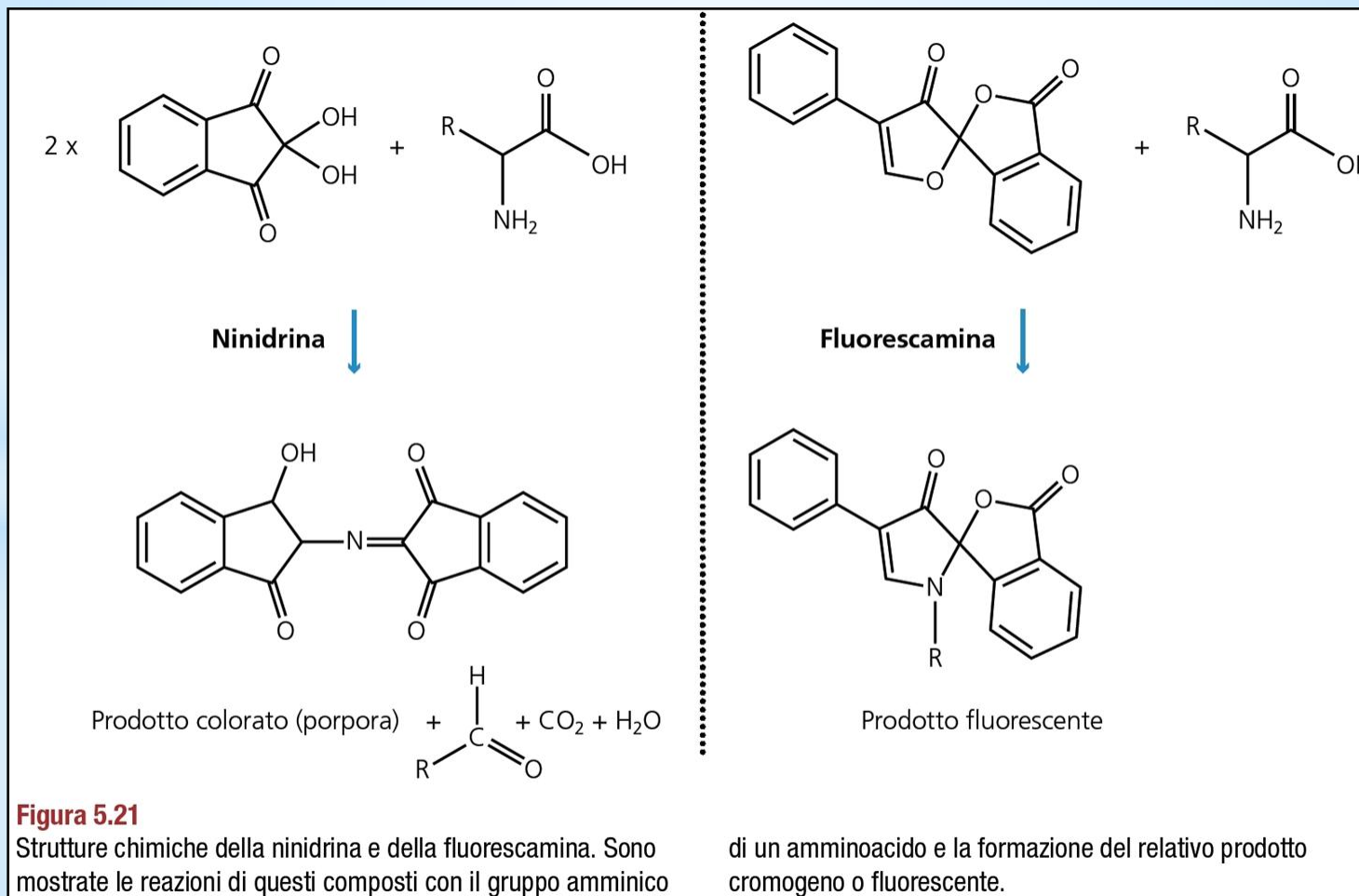
Il fattore di ritenzione è dato dal rapporto tra la distanza percorsa dalla sostanza A e quella percorsa dal solvente.



$$R_f = \frac{2.1}{2.8} = 0.75$$

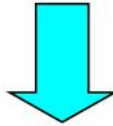
Il valore di  $R_f$  è compreso tra 0 e 1 ed è costante per ogni sistema cromatografico ed è una caratteristica della sostanza esaminata.

- ❖ I campioni che si sono separati sulla lastrina devono essere rilevati con delle colorazioni: es. gli aa e i composti amminici vengono rilevati spruzzando sulla lastrina una **soluzione di ninidrina** in acetone oppure **fluorescamina** rilevabile mediante luce UV



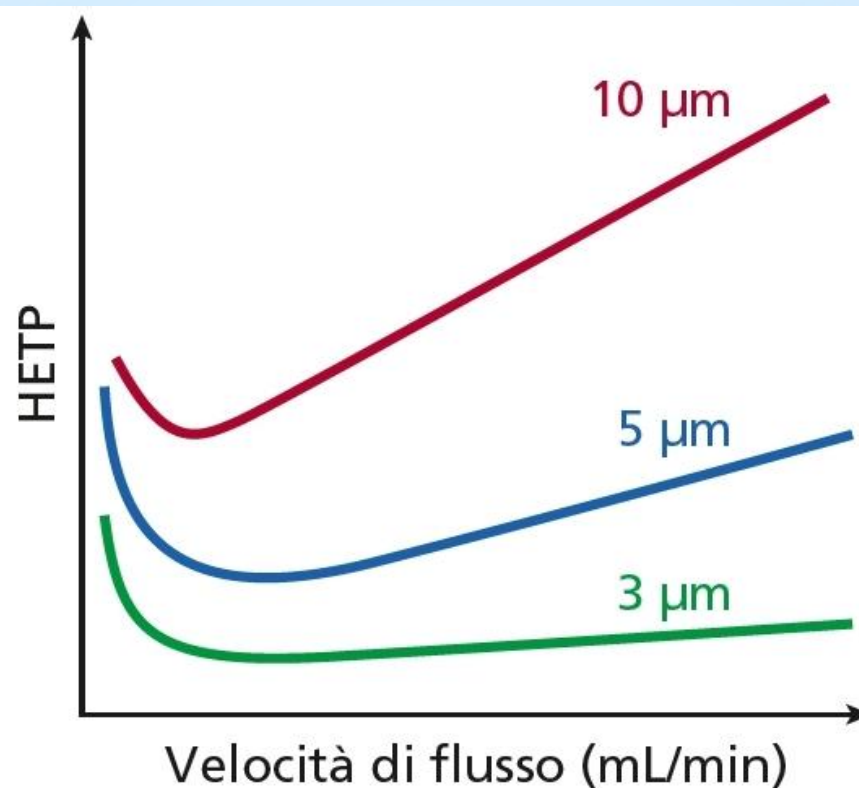
## HPLC: caratteristiche

- ❖ Fase stazionaria costituita da particelle molto piccole 3 - 10  $\mu\text{m}$
- ❖ Colonne di piccolo diametro 2 - 5 mm
- ❖ Pressioni di ingresso elevate
- ❖ Precisione nell'introduzione del campione
- ❖ Portata della fase mobile controllata
- ❖ Rivelatori in linea



**Elevata risoluzione  
Analisi rapide**

*NB: L'HPLC non è un metodo di separazione nuovo rispetto a quelli già illustrati, ma solo un sistema più sofisticato per sfruttare gli stessi principi al fine di ottenere prestazioni molto più elevate.*



### Figura 7.7

Effetto del diametro delle particelle di una fase stazionaria e della velocità del flusso della fase mobile sull'altezza dei piatti teorici (efficienza), come descritto nell'equazione di van Deemter.

# HPLC Vantaggi

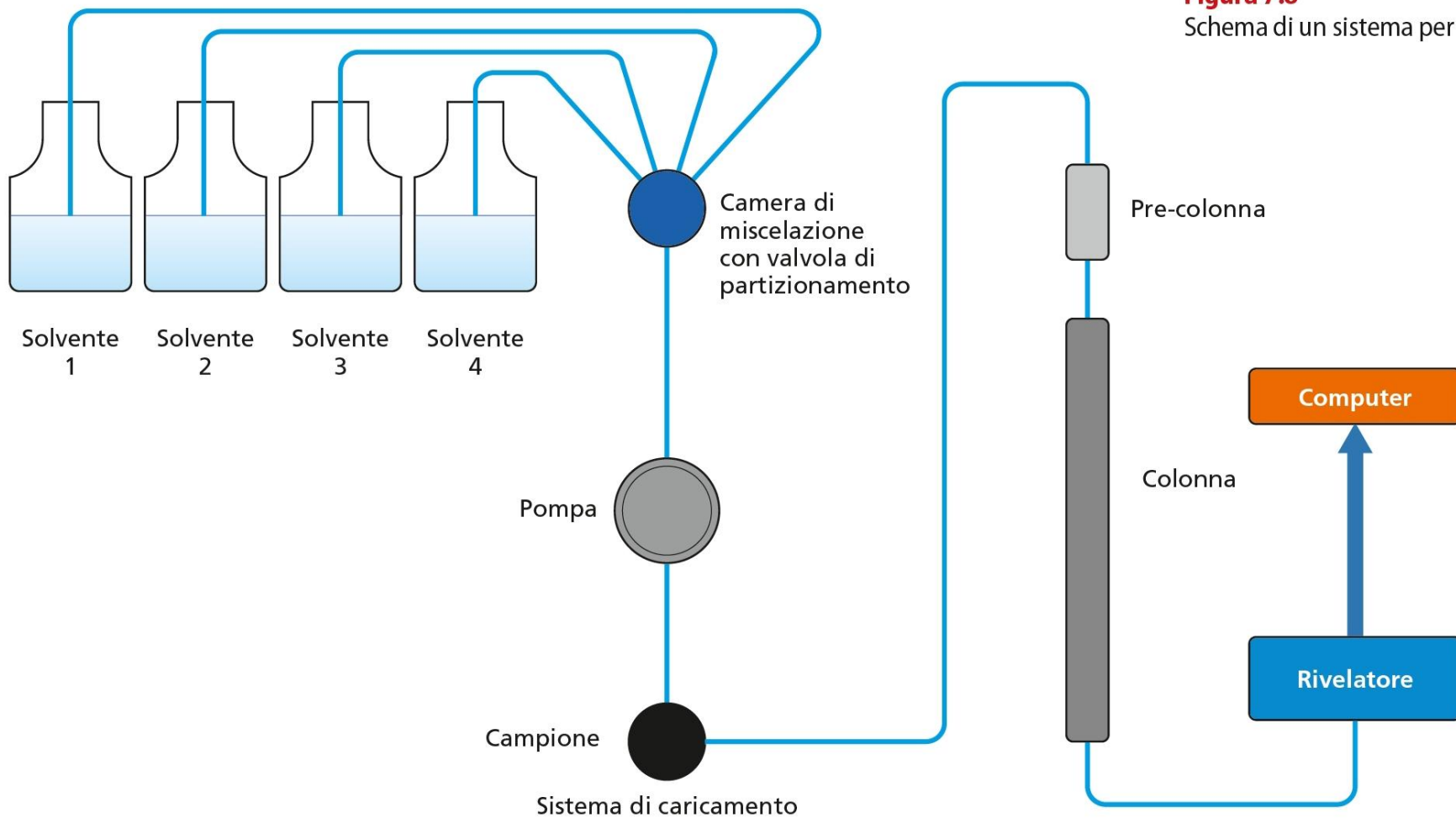


- ❖ **Rapidità e precisione in analisi quantitative**
  - Tipico tempo di analisi di 5 - 20 min.
  - Precisione RSD < 0.5 - 1%
- ❖ **Analisi automatizzate**
  - Usando autocampionatori ed elaboratori di dati
- ❖ **Alta sensibilità**
  - Limite di rivelabilità (LOD) di ng a pg
- ❖ **Recupero del campione quantitativo**
  - Tecniche preparative da  $\mu\text{g}$  a g
- ❖ **Adatta a diversi tipi di campioni**
  - Può analizzare > 60% di tutti i composti vs. 15% della GC

--

## Un cromatografo HPLC è costituito dalle seguenti parti:

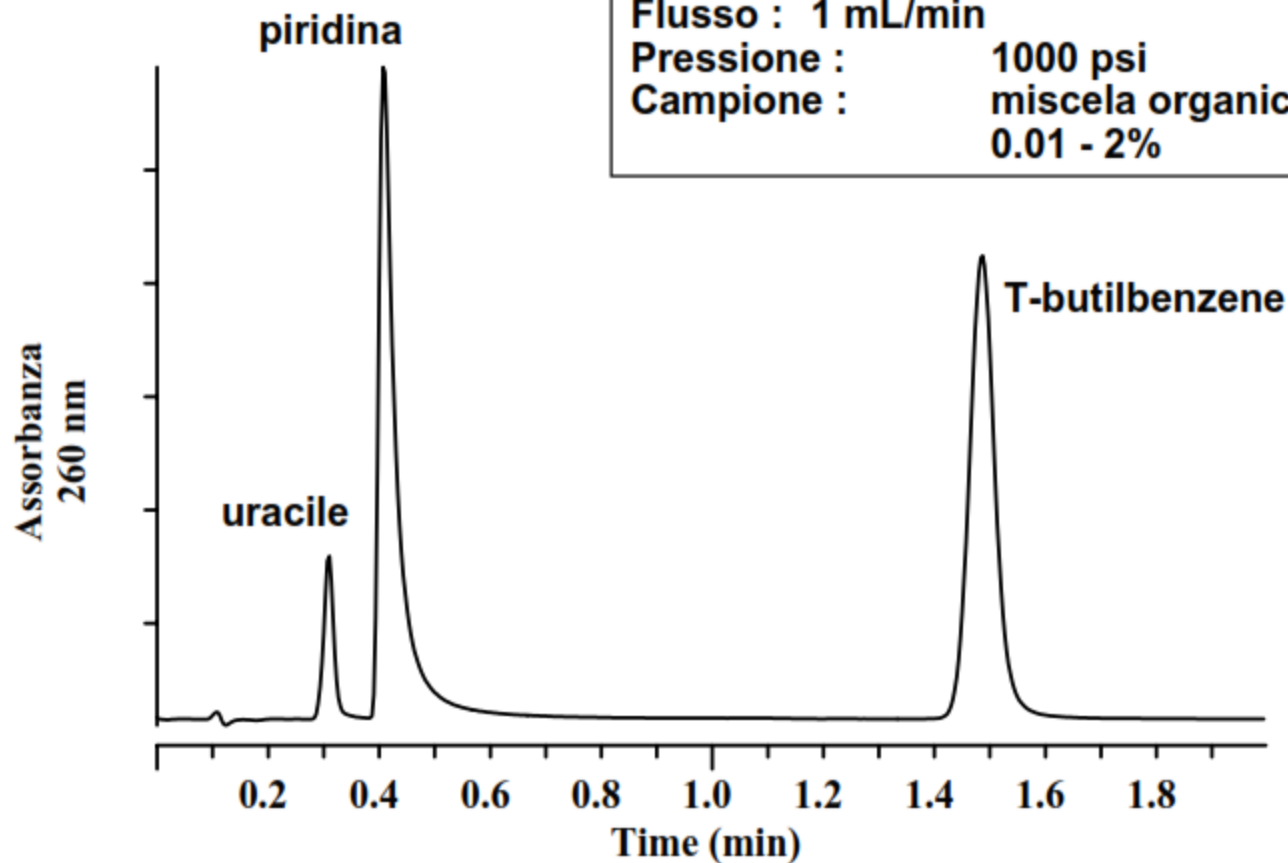
- **Riserva di solventi:** uno o più solventi che possono essere utilizzati singolarmente o in miscela;
- **Pompa:** con pressione fino a 400 atm e flusso stabile tra 0.1 e 10 ml/min;
- **Sistema di iniezione:** costituito da una valvola a più vie e da un circuito a volume fisso (o loop) nel quale mettere il campione;
- **Colonna cromatografica (ed eventuale precolonna);**
- **Rivelatore** per monitorare gli eluati;
- **PC** per gestire il sistema e i dati.

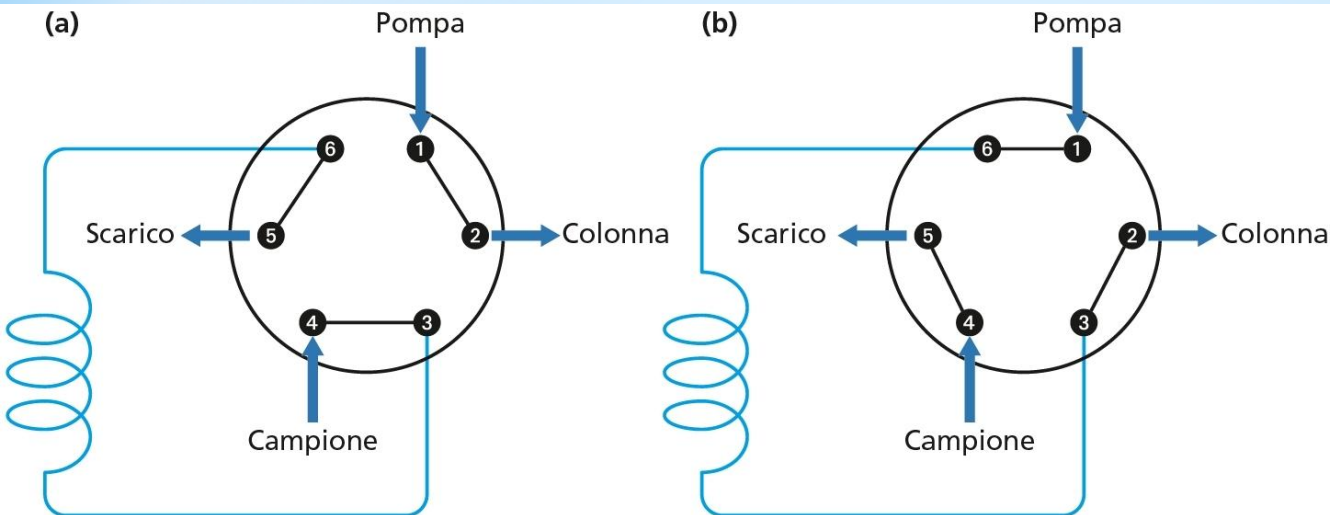


**Figura 7.8**  
 Schema di un sistema per HPLC.

# Esempio di cromatogramma HPLC

Colonna :	3x3 C18 (32 x 4.6 mm i.d.)
Fase mobile :	80% Metanolo in acqua
Flusso :	1 mL/min
Pressione :	1000 psi
Campione :	miscela organica 0.01 - 2%





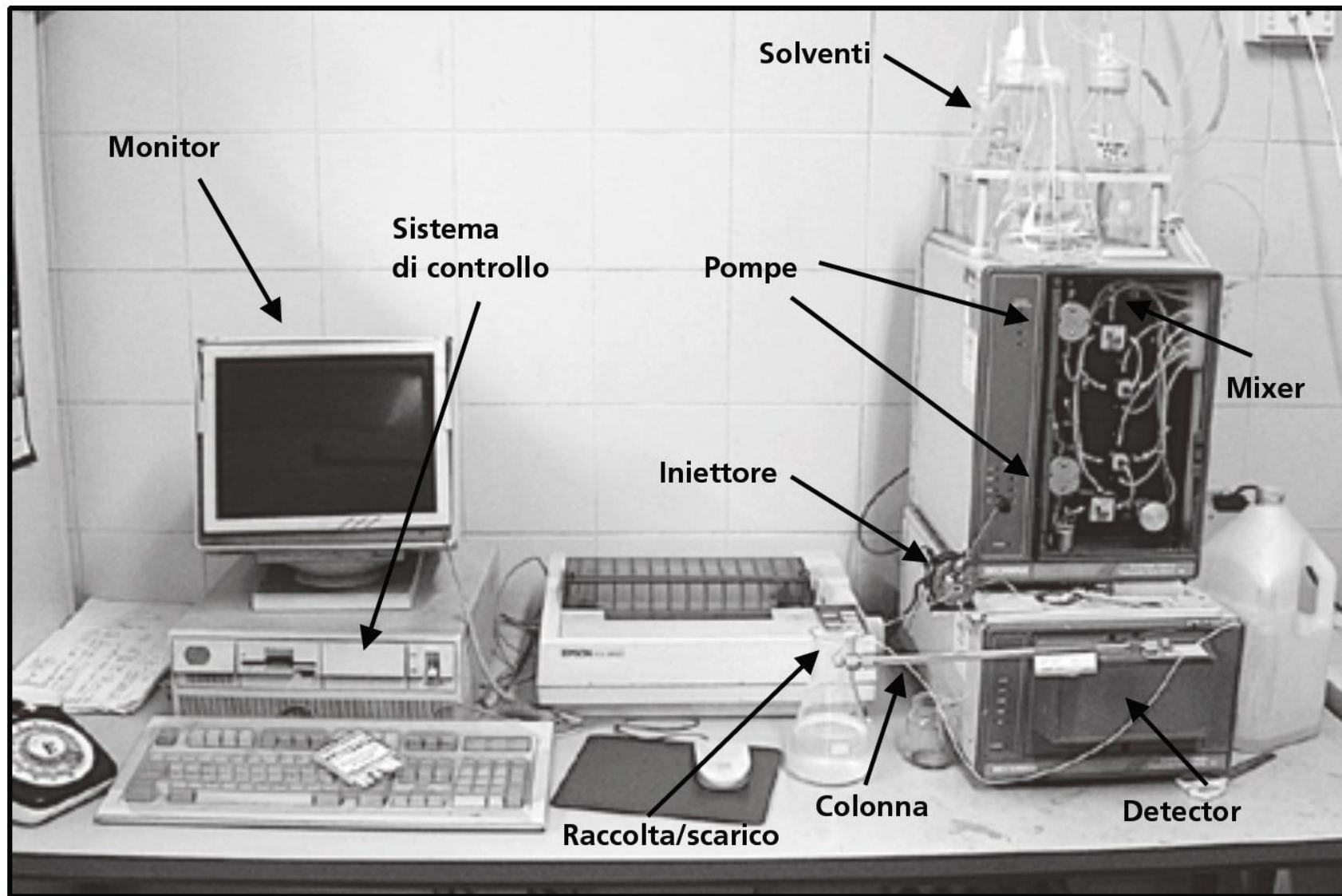
**Figura 7.9**

Sistema di caricamento a spirale. È illustrata la valvola a sei porte nella posizione di caricamento (a) e in quella di iniezione (b).

- ❖ La **lunghezza delle colonne** nella cromatografia HPLC varia da 10 a 30 cm, mentre **il loro diametro** interno dai 4 ai 10 mm. Le **particelle della fase stazionaria** hanno un diametro dai 5 ai 10  $\mu\text{m}$ , della quale la resina più utilizzata è la silice. Colonne di questo tipo arrivano generalmente a contenere dai 40000 ai 60000 piatti per metro di lunghezza.

Dal momento che vengono utilizzati dei volumi molto piccoli, i metodi di rivelamento devono essere molto sensibili e sono scelti in base alle singole esigenze:

- Rilevatore spettrofotometrico UV/visibile;
- Rilevatore a indice di rifrazione (RI);
- Rilevatore a fluorescenza;
- Spettrofotometro di massa.



### Figura 5.22

L'HPLC System Gold della ditta Beckman, un vecchio cavallo di battaglia di tanti laboratori di biochimica. In figura sono indicate le componenti principali del sistema.

- Quali sono i principi generali su cui si basa la cromatografia?
- Cosa si intende per fase mobile e fase stazionaria in un sistema cromatografico? Come avviene la separazione?
- Cosa si intende per risoluzione cromatografica ( $R_s$ )? Quali sono i fattori che la determinano?
- Descrivi le principali caratteristiche della cromatografia su colonna e le diverse tipologie (scambio ionico, affinità, adsorbimento, ripartizione).
- Spiega il principio di funzionamento della cromatografia su strato sottile (TLC). Come si determina il fattore di ritenzione ( $R_f$ )?
- Quali sono i vantaggi offerti dalla tecnica HPLC rispetto ad altre tecniche cromatografiche?

# \* DOMANDE DI RIPASSO