UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TERAMO

Cromatografia

Principi, tecniche e rivelatori

Chimica Analitica

CdL in Biotecnologie · a.a. 2026/2027

Prof. Federico Fanti

01

Principi della cromatografia

Dalle bande colorate di Tsvett alla separazione strumentale moderna

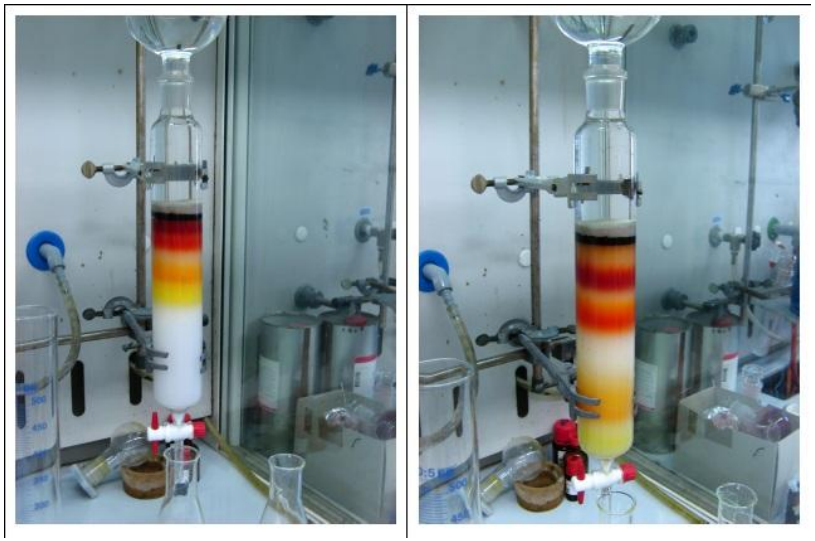
Le origini: Tsvett e la «scrittura con il colore»

L'esperimento del 1906

Il botanico russo Mikhail Tsvett impaccò una colonna di vetro con carbonato di calcio e vi fece scorrere un estratto di foglie in etere di petrolio. I pigmenti si separarono in bande colorate distinte lungo la colonna.

Il nome

Dalla comparsa delle bande deriva il termine cromatografia, dal greco chroma (colore) e graphein (scrivere). Oggi i colori non servono più: gli analiti vengono rivelati da un detector all'uscita della colonna.



Separazione di pigmenti vegetali in colonna: bande colorate prima e dopo l'eluizione.

Oltre un secolo di cromatografia

Ogni tappa ha ridotto l'allargamento delle bande o ampliato il campo di analiti separabili: la storia della cromatografia è una storia di efficienza crescente.

1906 **Tsvett** Separazione dei pigmenti fogliari su $CaCO_3$.

1941 **Martin e Synge** Cromatografia di ripartizione e teoria dei piatti. Nobel 1952.

1952 **James e Martin** Nasce la gascromatografia.

1956 **Van Deemter** Teoria cinetica dell'allargamento di banda.

1958 **Stahl** Standardizzazione della TLC.

Anni '60-'70 **HPLC** Pompe ad alta pressione e particelle piccole.

2004 **UHPLC** Particelle sub-2 µm e pressioni fino a 1000-1500 bar.

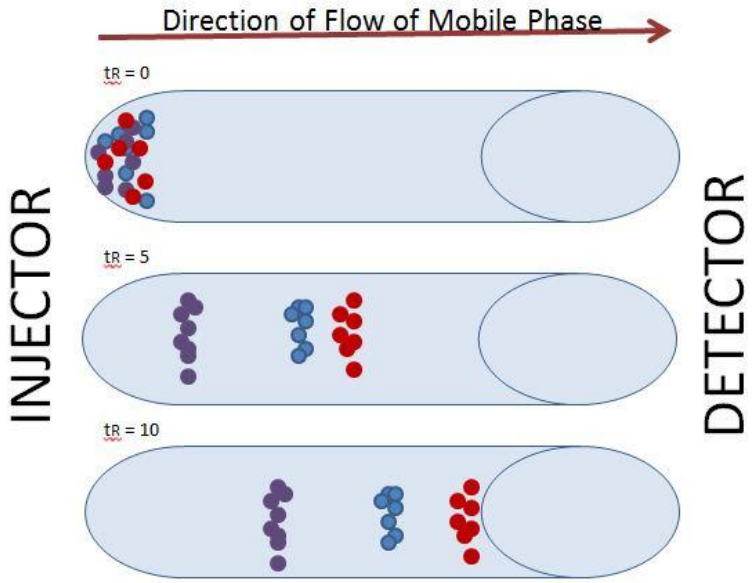
Il principio della separazione

Due fasi

Ogni metodo cromatografico usa una fase stazionaria, fissa in una colonna o su una superficie, e una fase mobile, liquida o gassosa, che la attraversa trasportando il campione. Il movimento della fase mobile è detto eluizione.

Ripartizione

Ogni componente si distribuisce tra le due fasi secondo la propria affinità. Le molecole più trattenute dalla fase stazionaria avanzano più lentamente, quelle poco trattenute escono prima: la differenza di velocità produce la separazione.



Separazione progressiva di una miscela lungo la colonna, dall'iniettore al rivelatore.

Il cromatogramma

Che cos'è

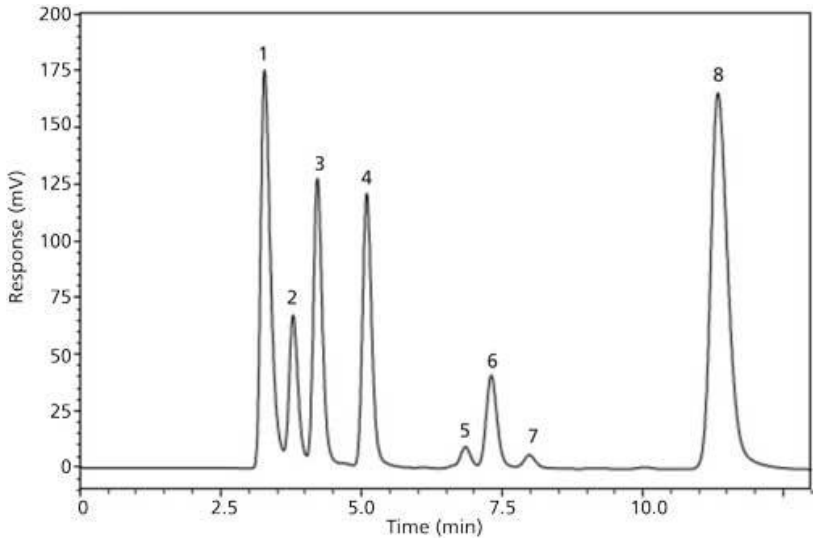
Il cromatogramma è il grafico del segnale del rivelatore in funzione del tempo. Ogni componente separato produce un picco, idealmente di forma gaussiana.

Informazione qualitativa

La posizione del picco, cioè il tempo di ritenzione, è caratteristica di un composto in condizioni definite e permette l'identificazione per confronto con standard.

Informazione quantitativa

L'area, o l'altezza, del picco è proporzionale alla quantità di analita e viene convertita in concentrazione tramite la curva di calibrazione. Servono quindi picchi ben definiti e separati.



Esempio di cromatogramma con otto componenti.

02

Tipologie di cromatografia

Classificazione per geometria, natura delle fasi e meccanismo di separazione

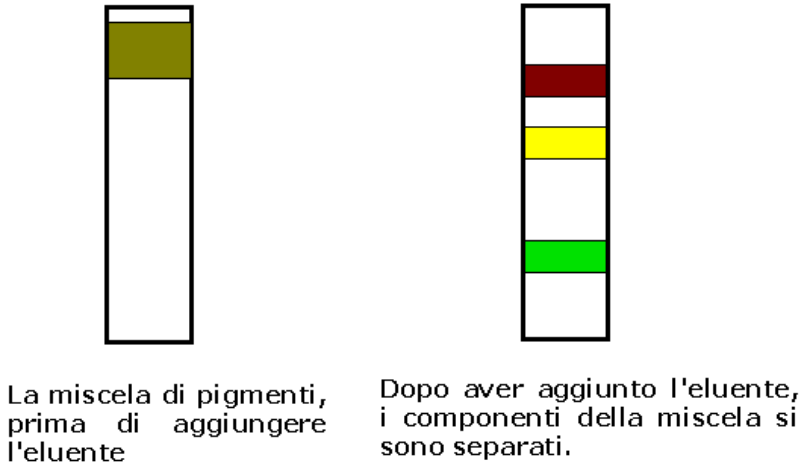
Cromatografia planare e su colonna

Planare

La fase stazionaria è distribuita su una superficie piana, come una lastra di gel di silice, e la fase mobile la risale per capillarità. Appartengono a questa famiglia la cromatografia su carta e la TLC.

Su colonna

La fase stazionaria è contenuta in un tubo e la fase mobile la attraversa per gravità o, nelle tecniche strumentali, spinta da una pompa o da un gas in pressione. Sono su colonna HPLC, UHPLC e GC.



Miscela di pigmenti prima e dopo l'aggiunta dell'eluente: i componenti si separano in bande.

TIPOLOGIE

Classificazione per fase mobile e meccanismo

Fase mobile	Metodo	Fase stazionaria	Meccanismo
Liquido (LC)	Liquido-solido	Solido adsorbente (silice, allumina)	Adsorbimento
	Fase legata	Gruppi organici legati alla silice	Ripartizione
	Scambio ionico	Resina con gruppi carichi	Scambio ionico
	Esclusione dimensionale	Particelle a porosità controllata	Volume idrodinamico
	Affinità	Ligando biospecifico immobilizzato	Riconoscimento molecolare
Gas (GC)	Gas-liquido	Liquido legato alla parete	Ripartizione
	Gas-solido	Solido adsorbente	Adsorbimento

La scelta della tecnica dipende dalla proprietà che distingue gli analiti: polarità, carica, dimensione, volatilità o affinità biologica.

Cromatografia di adsorbimento

Principio

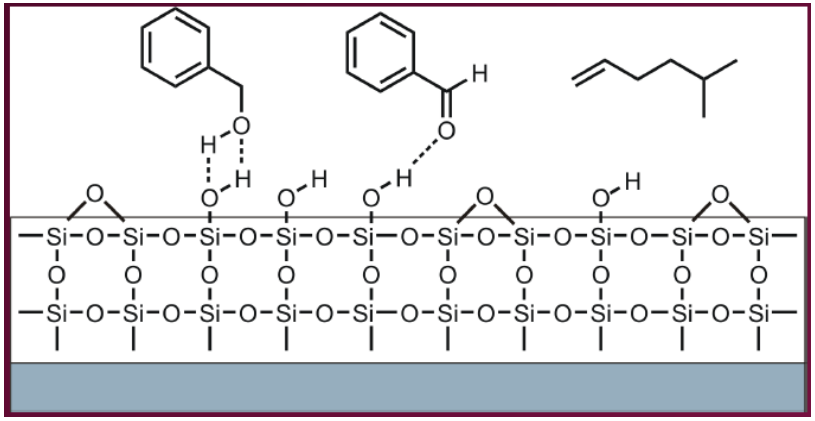
La fase stazionaria è un solido polare, tipicamente silice o allumina, con siti attivi superficiali. Gli analiti competono con le molecole di solvente per questi siti.

Interazioni

Prevalgono legami a idrogeno e interazioni dipolo-dipolo con i gruppi silanolici Si-OH, oltre a forze di dispersione. Più un composto è polare, più a lungo resta adsorbito.

Dove si usa

È il meccanismo della TLC su silice e della cromatografia in fase diretta, adatta a composti poco polari e a isomeri.



Interazione di analiti con i gruppi silanolici della superficie della silice.

Ripartizione e fasi legate

Ripartizione

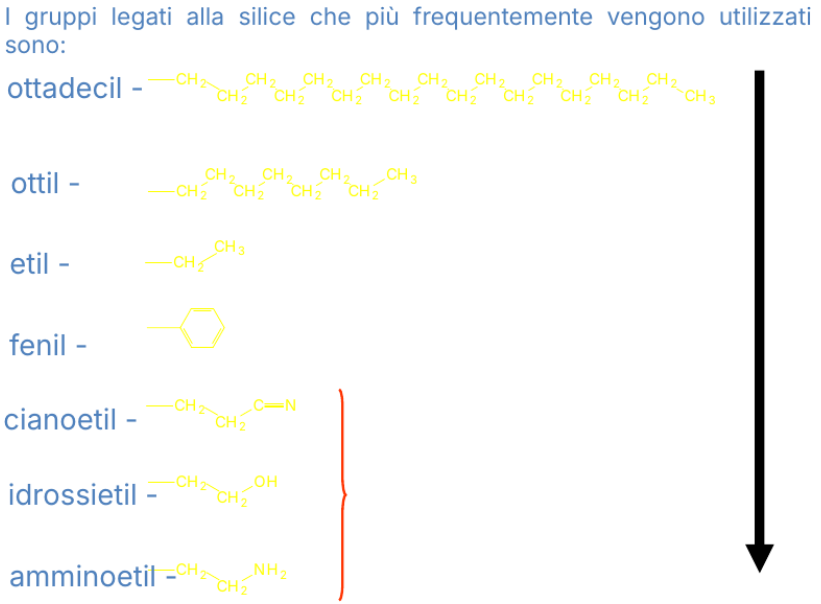
L'analita si distribuisce tra la fase mobile e un film liquido stazionario, come in un'estrazione liquido-liquido ripetuta migliaia di volte lungo la colonna.

Fasi legate

Oggi il liquido stazionario è sostituito da gruppi organici legati covalentemente alla silice, che hanno un comportamento pseudo-liquido. Non vengono dilavati e consentono l'eluizione a gradiente.

Polarità crescente

C18, C8, C4, fenile, ciano, diolo, ammino: la scelta del gruppo legato regola la selettività della colonna.



Gruppi più frequentemente legati alla silice, ordinati per polarità.

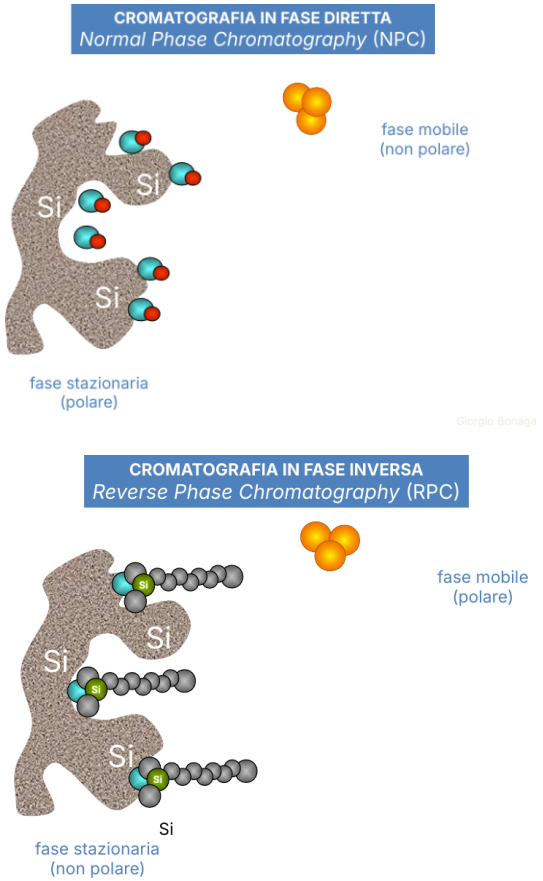
Fase inversa e fase diretta

Fase inversa (RPC)

Fase stazionaria apolare (C18, C8) e fase mobile polare (acqua con metanolo o acetonitrile). Eluiscono prima i composti polari. È la modalità più diffusa in HPLC e LC-MS.

Fase diretta (NPC)

Fase stazionaria polare (silice, ammino, diolo) e fase mobile poco polare (esano, etil acetato). Eluiscono prima i composti apolari; è utile per isomeri e composti poco solubili in acqua.



Fase diretta (in alto) e fase inversa (in basso) su supporto di silice.

Cromatografia a scambio ionico

Principio

La fase stazionaria porta gruppi carichi: solfonici o carbossilici negli scambiatori cationici, ammonici negli scambiatori anionici. Gli ioni dell'analita competono con gli ioni della fase mobile per questi siti.

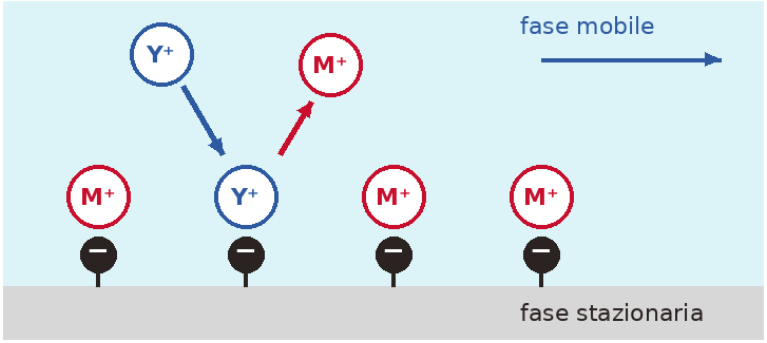
Ritenzione ed eluizione

La ritenzione cresce con la carica dello ione e diminuisce con il suo raggio idratato. Si eluisce aumentando la forza ionica o variando il pH, ad esempio con un gradiente salino.

Applicazioni

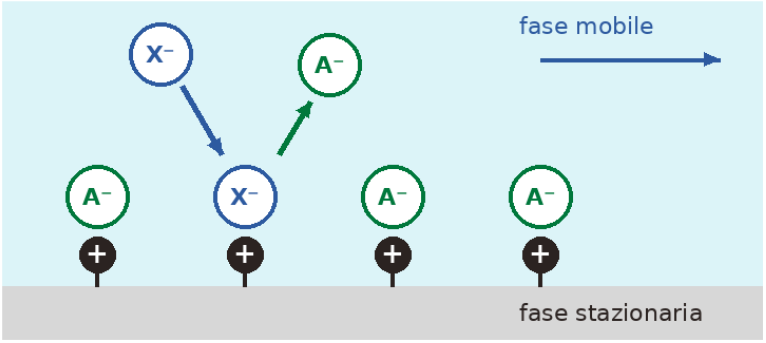
Purificazione di proteine e acidi nucleici, analisi di amminoacidi e cromatografia ionica di anioni e cationi inorganici.

Scambio cationico



$R\text{–}SO_3^- Y^+ + M^+ \rightleftharpoons R\text{–}SO_3^- M^+ + Y^+$

Scambio anionico



$R\text{–}N(CH_3)_3^+ X^- + A^- \rightleftharpoons R\text{–}N(CH_3)_3^+ A^- + X^-$

M^+, A^- = ioni dell'analita Y^+, X^- = ioni della fase mobile (eluente)

Scambio cationico e anionico sulla superficie della fase stazionaria.

Cromatografia di esclusione dimensionale

Principio

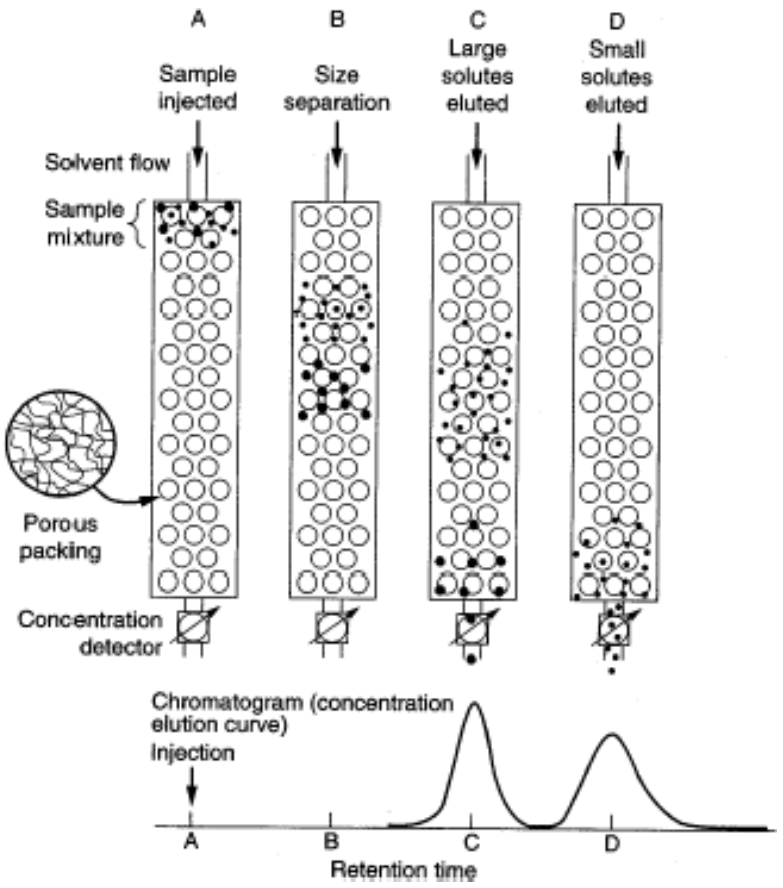
La fase stazionaria è formata da particelle con pori di dimensione controllata. Non c'è interazione chimica: la separazione dipende solo dal volume idrodinamico delle molecole.

Ordine di eluizione

Le molecole troppo grandi per entrare nei pori escono per prime nel volume morto. Le più piccole esplorano tutto il volume dei pori ed escono per ultime.

Applicazioni

Separazione di proteine e dei loro aggregati, desalificazione, stima della massa molare di polimeri e biomolecole.



Le molecole grandi sono escluse dai pori ed eluiscono prima delle piccole.

TIPOLOGIE

Cromatografia di affinità

La separazione sfrutta un riconoscimento biologico specifico tra l'analita e un ligando immobilizzato sulla fase stazionaria: è la tecnica di purificazione più selettiva per le biomolecole.

Principio

Il campione viene caricato in condizioni che favoriscono il legame; i contaminanti vengono lavati via e la molecola target viene eluita cambiando pH, forza ionica o aggiungendo un competitore.

IMAC

Ioni Ni^{2+} o Co^{2+} chelati sulla resina legano le proteine ricombinanti con coda di istidine (His-tag). L'eluizione avviene con imidazolo.

Proteina A e G

Legano la regione Fc delle immunoglobuline: sono lo standard industriale per la purificazione degli anticorpi monoclonali.

TLC: cromatografia su strato sottile

Che cos'è

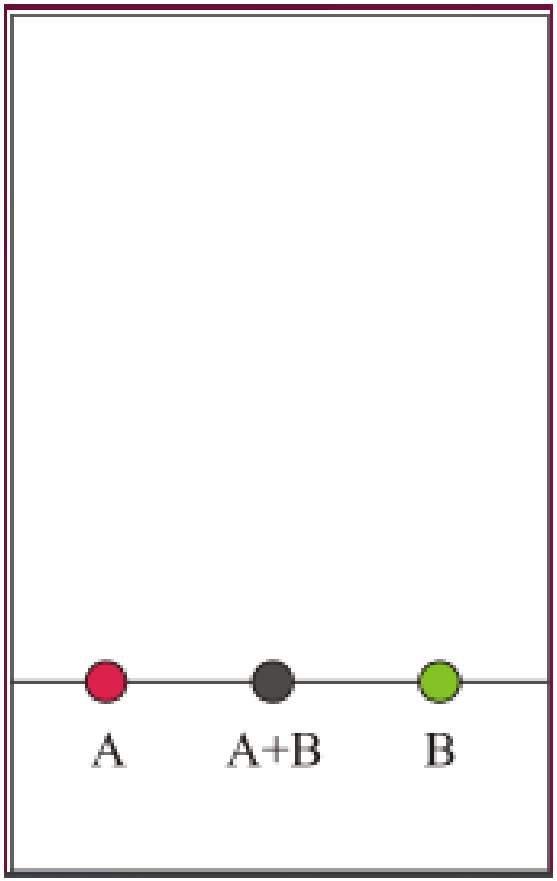
Una lastra di vetro, alluminio o plastica ricoperta da uno strato sottile di fase stazionaria, di solito gel di silice. Il campione si deposita alla base e la fase mobile risale per capillarità.

Fase diretta e inversa

Su silice il meccanismo è di adsorbimento e i composti polari migrano meno. Su silice modificata (RP-TLC) la fase mobile è polare e prevale la ripartizione.

Usi attuali

Screening rapido, controllo di reazioni e purezza, scelta dell'eluente prima di una separazione su colonna; l'HPTLC consente anche analisi quantitative.



Lastra TLC con standard A, standard B e miscela A+B.

TLC: fase stazionaria e fase mobile

Fase stazionaria

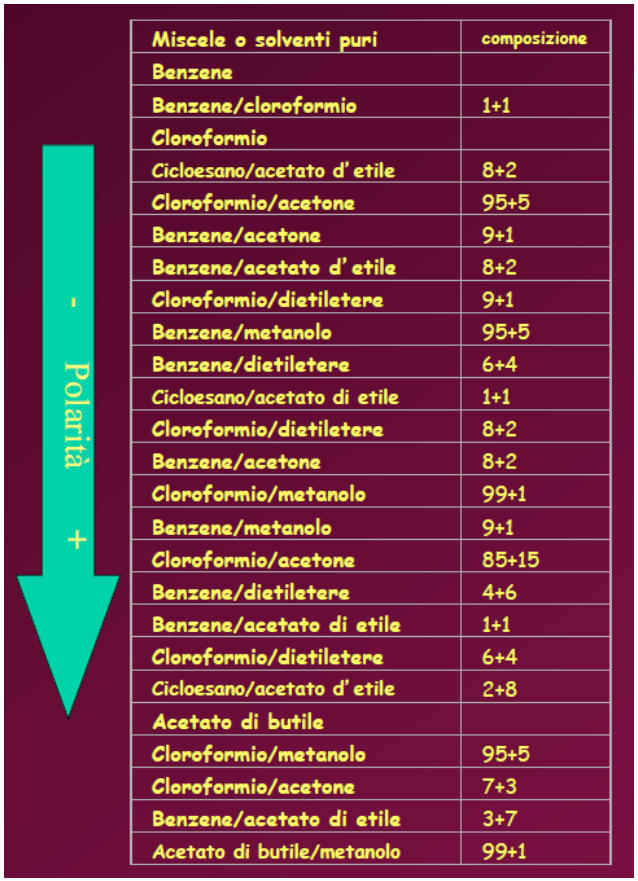
Il gel di silice è silice amorfa porosa con gruppi silanolici; si usano anche allumina e cellulosa. Lo spessore è di circa 250 µm per le lastre analitiche e 0,5-2 mm per quelle preparative.

Potere eluente

La capacità di un solvente di far migrare gli analiti dipende dalla sua polarità. La serie eluotropa ordina i solventi puri e le miscele per potere eluente crescente.

In pratica

Si parte da miscele poco polari e si aumenta progressivamente la componente polare finché gli Rf cadono tra 0,2 e 0,8.



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/dietiletere	9+1
Benzene/metanolo	95+5
Benzene/dietiletere	6+4
Cicloesano/acetato di etile	1+1
Cloroformio/dietiletere	8+2
Benzene/acetone	8+2
Cloroformio/metanolo	99+1
Benzene/metanolo	9+1
Cloroformio/acetone	85+15
Benzene/dietiletere	4+6
Benzene/acetato di etile	1+1
Cloroformio/dietiletere	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

Serie eluotropa di solventi e miscele, per polarità crescente.

TLC: deposizione e sviluppo

Deposizione

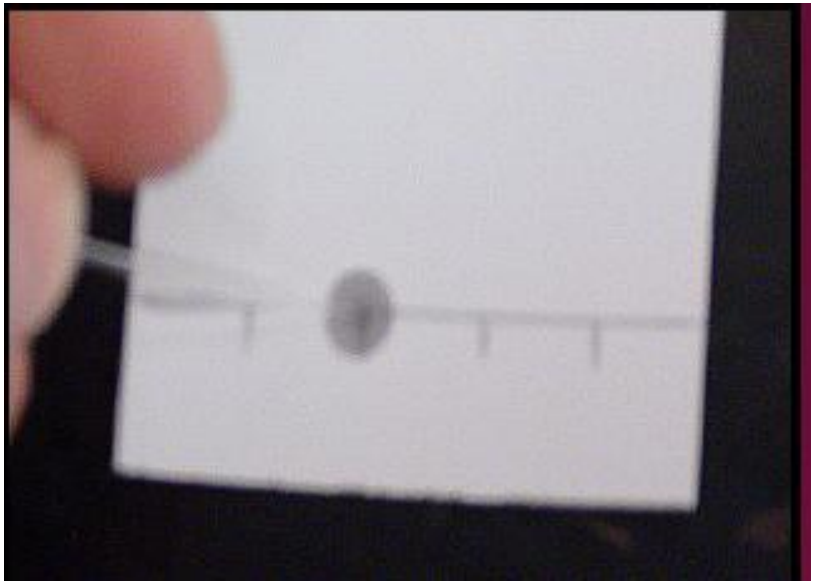
Il campione si deposita con un capillare a circa 1 cm dal bordo inferiore, come macchia o banda, il più compatto possibile e senza incidere lo strato. Per campioni diluiti si ripete la deposizione asciugando tra un'aggiunta e l'altra.

Sviluppo

La lastra si pone in una camera satura di vapori dell'eluente, con il livello del solvente sotto la linea di deposizione. Quando il fronte è vicino al bordo superiore si estrae la lastra e se ne segna la posizione.

Rivelazione

Lampada UV a 254 nm su lastre fluorescenti, oppure reattivi cromogeni come ninidrina o iodio.



Deposizione del campione con capillare.

TLC: fattore di ritardo R_f

$$R_f = d_{analita} / d_{fronte}$$

Definizione

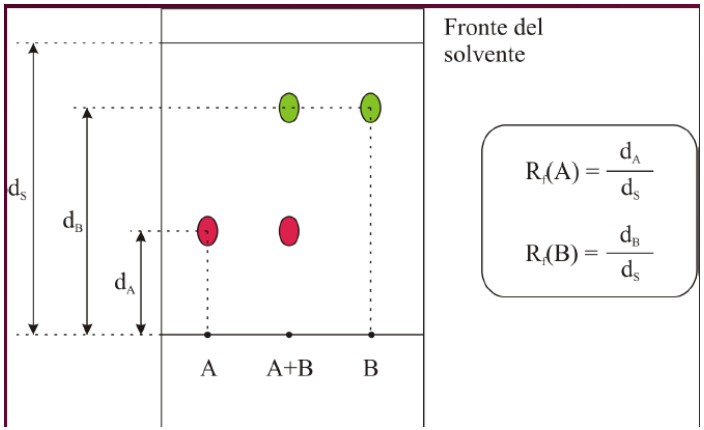
R_f è il rapporto tra la distanza percorsa dalla macchia e quella percorsa dal fronte del solvente, ed è sempre compreso tra 0 e 1.

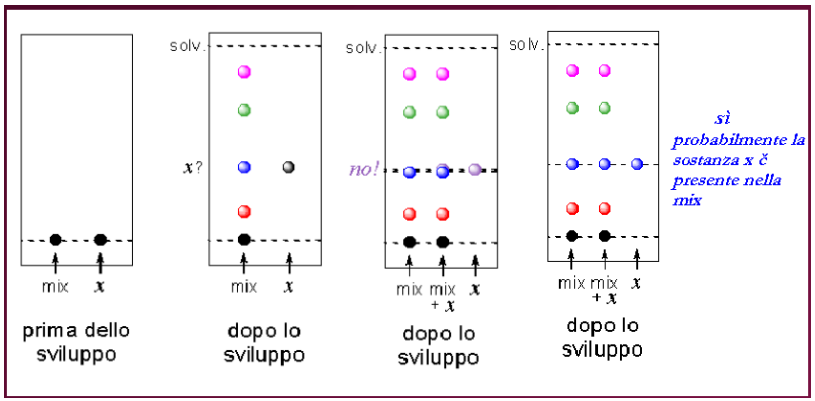
Da cosa dipende

Attività e porosità della fase stazionaria, spessore dello strato, composizione dell'eluente, temperatura e saturazione della camera.

Identificazione

Il confronto con uno standard è valido solo sulla stessa lastra e nello stesso sviluppo: R_f uguali suggeriscono identità, R_f diversi la escludono.





Calcolo di R_f e confronto di campioni con standard sulla stessa lastra.

03

Teoria della separazione

Ritenzione, efficienza e risoluzione

TEORIA

Migrazione differenziale in colonna

Cosa succede

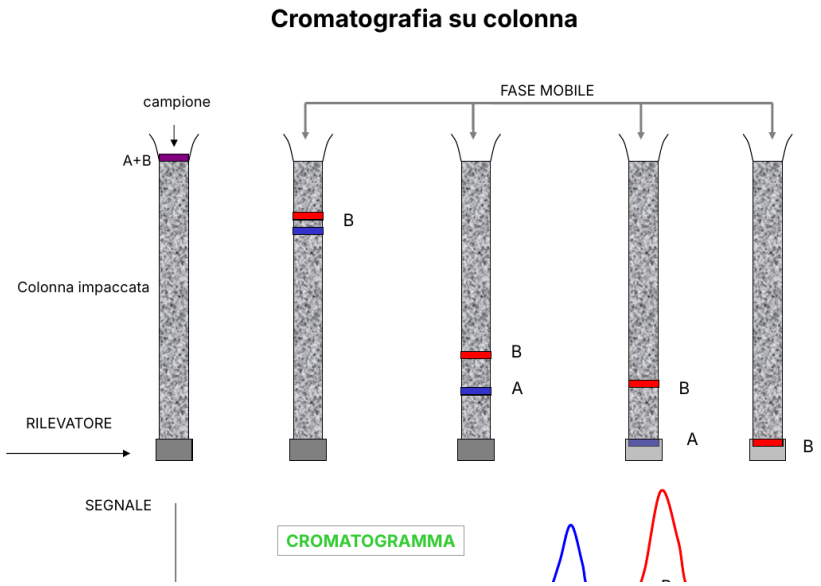
La miscela A+B viene introdotta in testa alla colonna. La fase mobile trasporta i componenti, che si distribuiscono tra le due fasi con affinità diverse.

Separazione

B, più trattenuto, avanza più lentamente di A. All'uscita i due componenti arrivano al rivelatore in tempi diversi e producono due picchi distinti nel cromatogramma.

Il prezzo

Durante il percorso ogni banda si allarga: la separazione riesce solo se le bande si allontanano più velocemente di quanto si allarghino.



Separazione di A e B lungo la colonna e cromatogramma risultante.

Il soluto avanza solo nella fase mobile

Il meccanismo

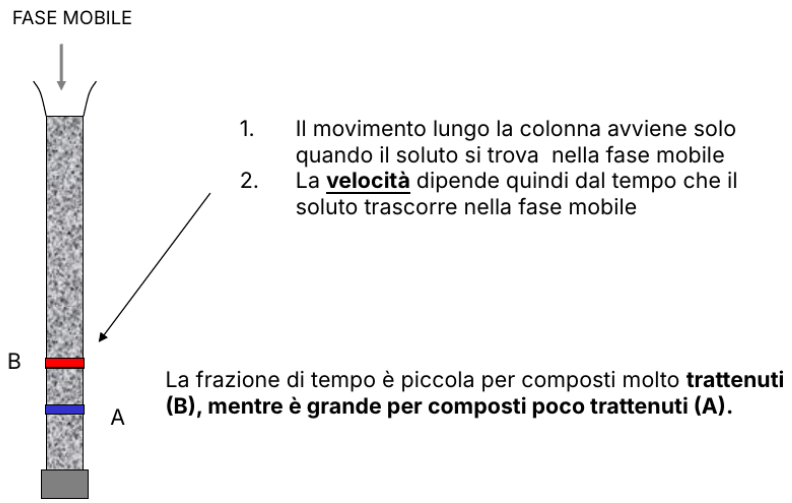
Una molecola si sposta lungo la colonna solo quando si trova nella fase mobile; quando è trattenuta dalla fase stazionaria resta ferma.

La velocità

La velocità media di un soluto dipende quindi dalla frazione di tempo che trascorre nella fase mobile: piccola per i composti molto trattenuti (B), grande per quelli poco trattenuti (A).

Conseguenza

La ripartizione tra le fasi determina i tempi di eluizione e quindi la possibilità di separare miscele complesse.



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

Frazione di tempo in fase mobile per un composto poco (A) e molto (B) trattenuto.

TEORIA

Il coefficiente di distribuzione K

$$K = c_S / c_M$$

Definizione

K è il rapporto tra la concentrazione dell'analita nella fase stazionaria e nella fase mobile all'equilibrio. Ogni composto ha un proprio K in un dato sistema cromatografico.

Isoterma lineare

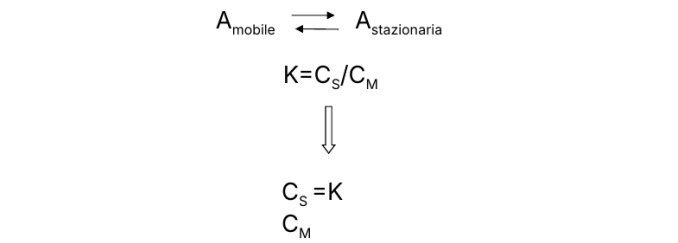
In un ampio intervallo di concentrazioni K è costante: il tempo di eluizione non dipende quindi dalla quantità iniettata e i picchi restano simmetrici.

Quando non vale

Ad alte concentrazioni l'isoterma diventa non lineare e i picchi si deformano: è l'origine del sovraccarico di colonna.

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

Rapporto di ripartizione o coefficiente di ripartizione



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

Equilibrio di distribuzione tra fase mobile e fase stazionaria.

Tempo morto e tempo di ritenzione

$$v = L / t_R \qquad u = L / t_M$$

t_M, tempo morto

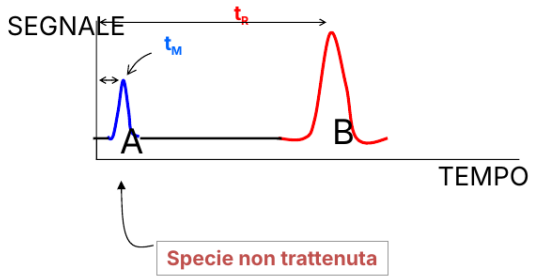
È il tempo impiegato da una specie non trattenuta, che viaggia alla velocità della fase mobile. Corrisponde al volume morto della colonna.

t_R, tempo di ritenzione

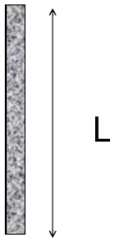
È il tempo tra l'iniezione e il massimo del picco. La differenza $t_R - t_M$ è il tempo trascorso nella fase stazionaria.

Velocità lineari

v è la velocità media del soluto, u quella della fase mobile; L è la lunghezza della colonna. Poiché il soluto sosta nella fase stazionaria, v è sempre minore di u.



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

$$v = L/T_R$$

$$u = L/T_M$$

Tempo morto, tempo di ritenzione e velocità lineari.

TEORIA

Fattore di ritenzione k e selettività α

$$k = (t_R - t_M) / t_M \qquad \alpha = k_2 / k_1 \quad (k_2 > k_1)$$

Fattore di ritenzione k

Esprime quanto più a lungo un analita resta nella fase stazionaria rispetto alla mobile. Valori tra 2 e 10 sono un buon compromesso: con $k < 1$ l'analita esce vicino al tempo morto, con k molto alto l'analisi si allunga e i picchi si allargano.

Selettività α

È il rapporto tra i fattori di ritenzione di due picchi adiacenti. Con $\alpha = 1$ i due composti coeluiscono qualunque sia l'efficienza; per separarli bisogna cambiare la chimica del sistema.

Come si modificano

k si regola soprattutto con la forza della fase mobile; α cambiando fase stazionaria, solvente organico, pH o temperatura.

Allargamento di banda e picco gaussiano

Un processo casuale

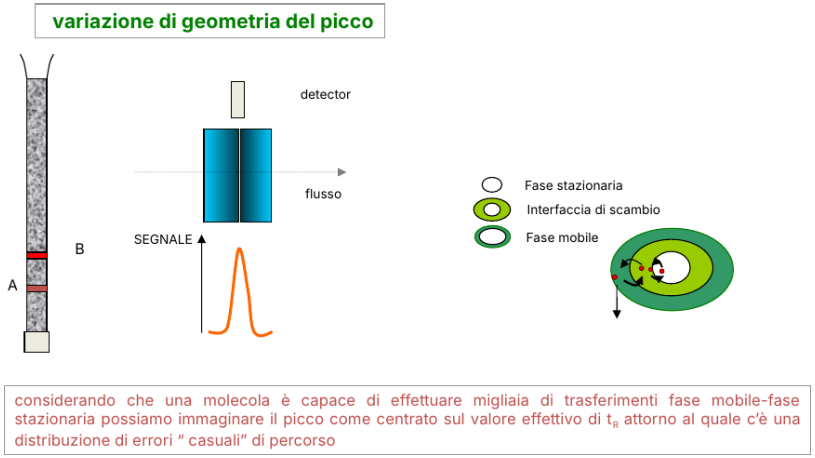
Ogni molecola compie migliaia di trasferimenti tra fase mobile e fase stazionaria, con percorsi e tempi di sosta leggermente diversi.

Forma del picco

La somma di questi eventi casuali produce una distribuzione gaussiana centrata sul tempo di ritenzione. La sua ampiezza, misurata dalla deviazione standard σ, cresce con la lunghezza percorsa.

Obiettivo

Una colonna efficiente mantiene le bande strette. Misurare e ridurre questo allargamento è lo scopo della teoria dei piatti e dell'equazione di Van Deemter.



Trasferimenti all'interfaccia tra le fasi e picco risultante.

TEORIA

Efficienza: i piatti teorici

$$H = \sigma^2 / L \qquad N = L / H$$

Il modello

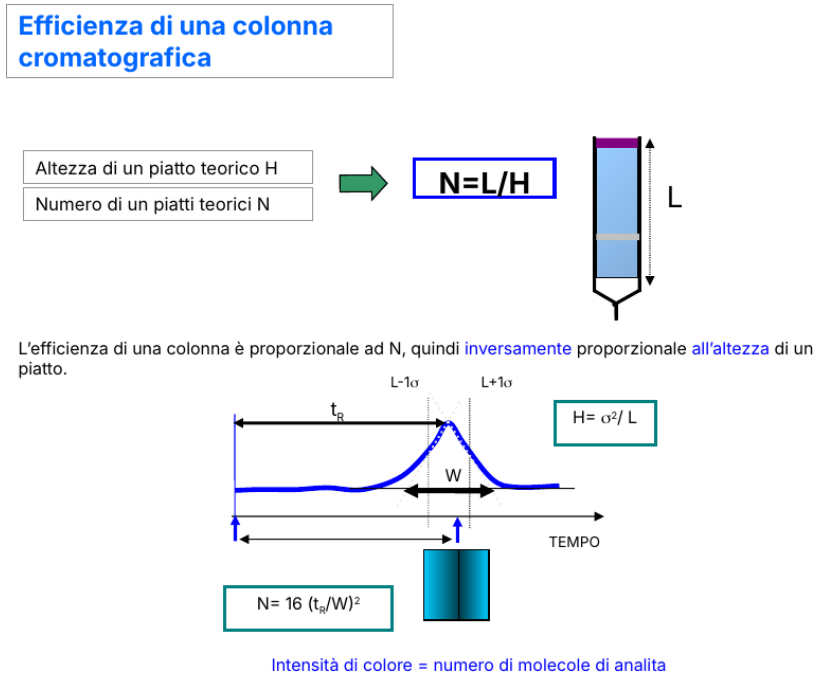
Martin e Synge immaginarono la colonna come una serie di stadi, i piatti teorici, in ciascuno dei quali l'analita raggiunge l'equilibrio tra le due fasi.

Altezza del piatto H

È la lunghezza di colonna corrispondente a un piatto, e misura l'allargamento per unità di lunghezza. Più H è piccolo, più la colonna è efficiente.

Numero di piatti N

A parità di lunghezza, un N più alto significa picchi più stretti e quindi una migliore capacità di separare composti vicini.



Altezza del piatto, numero di piatti e misura di N dal picco.

TEORIA

Misurare N dal cromatogramma

$$N = 16\,(t_R / w)^2 \qquad N = 5{,}54\,(t_R / w_{1/2})^2$$

Larghezza alla base w

Si ottiene tracciando le tangenti ai flessi del picco fino alla linea di base: per una gaussiana $w = 4\sigma$. Il metodo è sensibile alla scelta delle tangenti.

Larghezza a metà altezza $w_{1/2}$

Più semplice e riproducibile, è il metodo usato dai software di integrazione e dalle farmacopee: $w_{1/2} = 2{,}355\sigma$.

Valori tipici

Una colonna HPLC di 15 cm con particelle da 3-5 µm offre 10.000-20.000 piatti; una capillare GC di 30 m supera i 100.000.

Equazione di Van Deemter: i tre termini

$$H = A + B/u + (C_S + C_M)\,u$$

A · cammini multipli

Le molecole seguono percorsi di lunghezza diversa tra le particelle. Dipende dalle dimensioni e dall'uniformità dell'impaccamento; è assente nelle colonne capillari aperte.

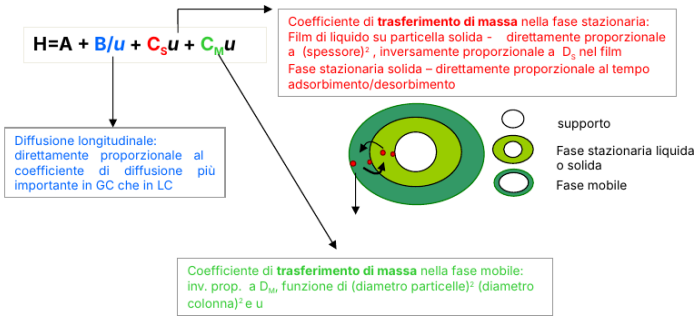
B/u · diffusione longitudinale

Le molecole diffondono lungo l'asse della colonna; il contributo pesa a basse velocità ed è molto più importante in GC che in LC.

C·u · trasferimento di massa

L'equilibrio tra le fasi non è istantaneo; il contributo cresce con la velocità e con il diametro delle particelle e lo spessore del film.

Teoria dell'allargamento della banda; equazione di Van Deemter



Contributi all'allargamento di banda nell'equazione di Van Deemter.

La curva di Van Deemter

$$u_{ott} = \sqrt{(B / (C_S + C_M))}$$

Forma della curva

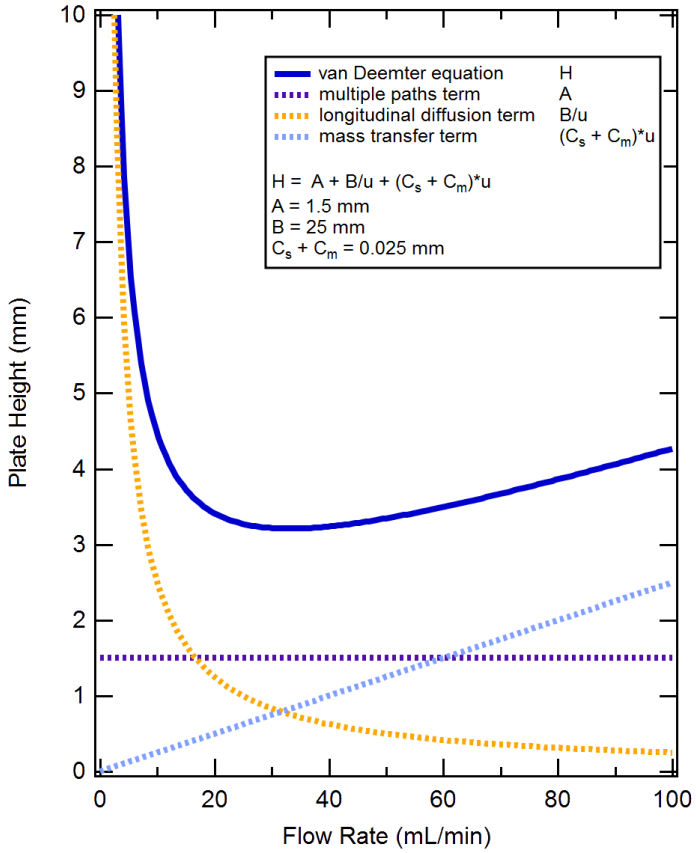
Sommando i tre termini, H in funzione della velocità lineare u descrive una curva con un minimo: a basse velocità domina la diffusione longitudinale, ad alte il trasferimento di massa.

Velocità ottimale

In corrispondenza del minimo si ottiene la massima efficienza. Lavorare poco sopra l'ottimo accorcia l'analisi con una perdita di efficienza contenuta.

In pratica

La curva si costruisce misurando N a diversi flussi ed è il criterio per scegliere il flusso di lavoro.



Curva di Van Deemter e contributi dei singoli termini.

TEORIA

Asimmetria dei picchi: tailing e fronting

$$A_s = b / a \quad \text{(al 10\% dell'altezza)}$$

Tailing ($A_s > 1$)

Coda verso tempi maggiori. In fase inversa è spesso causato da interazioni secondarie con silanoli residui, soprattutto per le basi; contribuiscono anche volumi morti e colonne deteriorate.

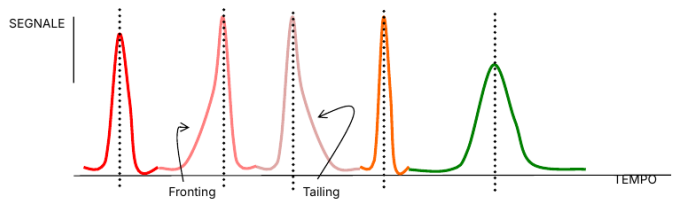
Fronting ($A_s < 1$)

Allargamento sul lato anteriore, tipico del sovraccarico di colonna o di un solvente di iniezione più forte della fase mobile.

Perché conta

I picchi asimmetrici riducono la risoluzione e rendono meno precisa l'integrazione dell'area.

Geometria del picco e efficienza della colonna



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

Picco simmetrico, fronting e tailing.

Risoluzione

$$R_s = 2\,[\,(t_R)_B - (t_R)_A\,] \,/\, (w_A + w_B)$$

Definizione

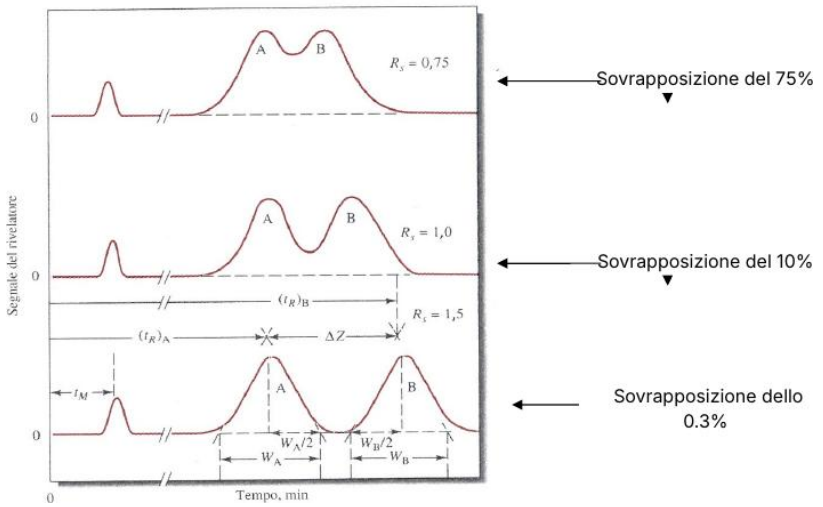
La risoluzione confronta la distanza tra due picchi con la loro larghezza: due picchi lontani ma larghi possono essere separati peggio di due picchi vicini ma stretti.

Valori di riferimento

Con R_s = 0,75 i picchi sono molto sovrapposti; con R_s = 1 la sovrapposizione è circa del 2%; con R_s = 1,5 si ha la separazione alla linea di base, con sovrapposizione dello 0,3%.

Risoluzione di una colonna

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



Sovrapposizione di due picchi al crescere della risoluzione.

Risoluzione e quantificazione

Picchi sovrapposti

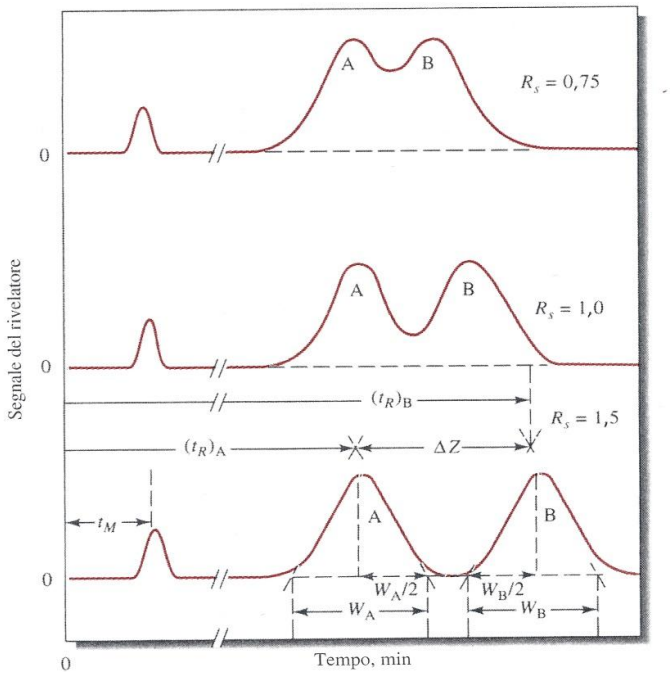
Quando due picchi non sono risolti, l'integrazione deve dividere arbitrariamente l'area comune: l'errore sulla quantificazione cresce rapidamente al diminuire di R_s.

Picchi di altezza diversa

Un picco piccolo accanto a uno grande richiede una risoluzione maggiore, perché la coda del picco principale nasconde il minore.

Obiettivo pratico

Si ottimizza la separazione per la coppia di picchi più critica, cioè quella con la risoluzione più bassa.



Separazioni con sovrapposizione del 75%, del 10% e dello 0,3%.

TEORIA

Equazione di Purnell: come migliorare la risoluzione

$$R_s = (\sqrt{N} / 4) \cdot ((\alpha - 1) / \alpha) \cdot (k / (1 + k))$$

Efficienza N

Colonne più lunghe o particelle più piccole aumentano N, ma R_s cresce solo con √N: raddoppiare la lunghezza migliora la risoluzione del 41% e raddoppia il tempo di analisi.

Selettività α

È il termine più potente: piccoli aumenti di α producono grandi guadagni. Si agisce su fase stazionaria, solvente organico, pH e temperatura.

Ritenzione k

Aumentare k è utile quando è basso; oltre k ≈ 10 il fattore k/(1+k) è quasi pari a 1 e il guadagno diventa trascurabile.

Esercizio svolto: k, α, N e R_s

Dati Colonna C18 da 15 cm. Tempo morto t_M = 1,0 min. Picco A: t_R = 5,0 min, w = 0,40 min. Picco B: t_R = 5,6 min, w = 0,44 min.

k	$k_A = (5{,}0 - 1{,}0)/1{,}0 = 4{,}0 \quad k_B = (5{,}6 - 1{,}0)/1{,}0 = 4{,}6$
α	$\alpha = 4{,}6 / 4{,}0 = 1{,}15$
N	$N_A = 16\,(5{,}0/0{,}40)^2 = 2500 \quad H = 150\ \text{mm} / 2500 = 0{,}06\ \text{mm}$
R_s	$R_s = 2\,(5{,}6 - 5{,}0) / (0{,}40 + 0{,}44) = 1{,}43$

Conclusione R_s è appena sotto 1,5. Con k già ottimale conviene aumentare N (colonna più lunga o particelle più piccole) oppure α (cambiare solvente organico o temperatura).

04

Cromatografia liquida ad alte prestazioni

Strumentazione, colonne, fasi e ottimizzazione

Schema di un sistema HPLC

Ogni componente contribuisce all'allargamento di banda: tubi lunghi, raccordi mal eseguiti e celle di grande volume degradano l'efficienza ottenuta in colonna.



Colonne e precolonna

La colonna

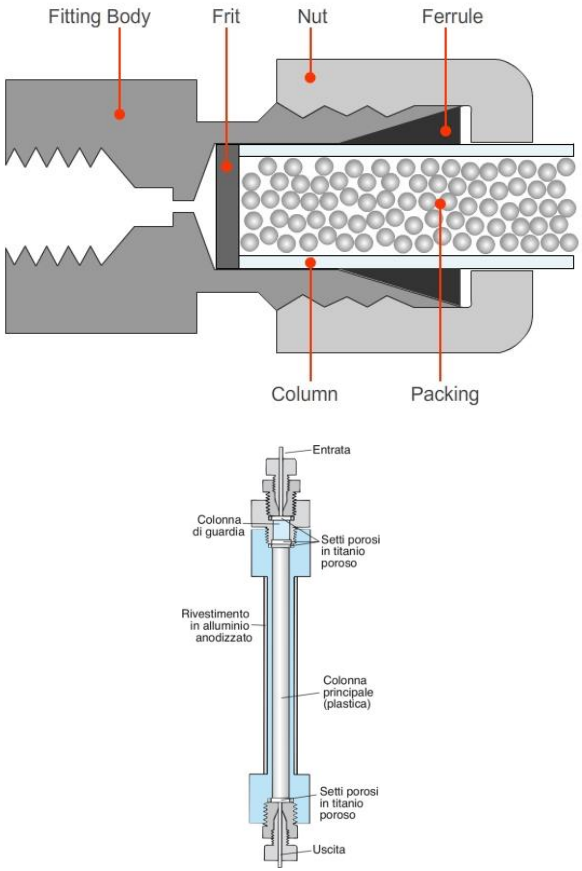
Tubo in acciaio inox o PEEK, lungo tipicamente 5-25 cm con diametro interno da 2,1 a 4,6 mm, impaccato con particelle e chiuso da setti porosi che distribuiscono il flusso.

La precolonna

Breve colonna sacrificale posta prima della colonna analitica: trattiene particelle e componenti della matrice che si legherebbero irreversibilmente, prolungando la vita della colonna.

Termostatazione

La temperatura influenza ritenzione, viscosità e pressione: va mantenuta costante.



Raccordo e impaccamento; schema di colonna con precolonna.

Contropressione

$$\Delta P = \eta L u / (\theta d_p^2)$$

Da cosa dipende

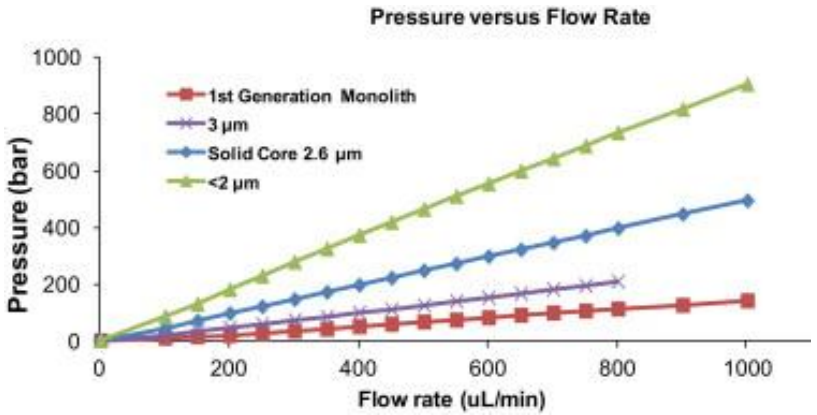
La caduta di pressione cresce con la viscosità della fase mobile η, la lunghezza della colonna L e la velocità lineare u, ed è inversamente proporzionale al quadrato del diametro delle particelle d_p.

Il compromesso

Dimezzare il diametro delle particelle migliora l'efficienza ma quadruplica la pressione. È il motivo per cui le particelle sub-2 µm richiedono sistemi UHPLC.

In pratica

Le miscele acqua-metanolo hanno un massimo di viscosità intorno al 50%: la pressione varia durante un gradiente.



Pressione in funzione del flusso per diverse tipologie di particelle.

Particelle porose e sub-2 µm

Particelle porose

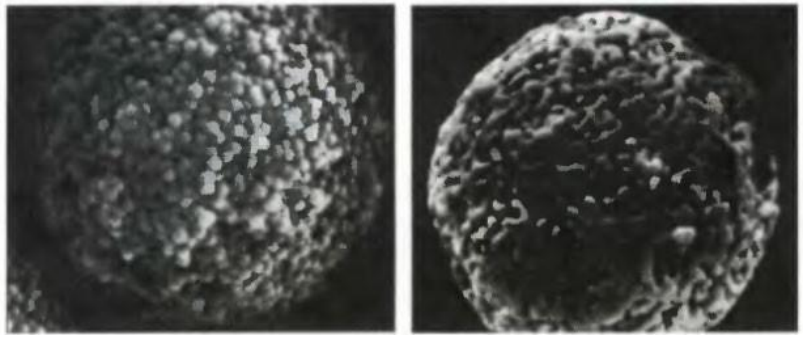
Sferette di silice di 3-5 µm con pori di 80-120 Å e superficie di centinaia di m^2/g: offrono elevata capacità e sono lo standard delle colonne HPLC.

Particelle sub-2 µm

Riducono i termini A e C di Van Deemter: H è più basso e resta basso anche a velocità elevate. Si ottengono separazioni più rapide ed efficienti, al prezzo di pressioni fino a 1000-1500 bar (UHPLC).

Pori larghi

Per peptidi e proteine si usano pori da 300 Å, che permettono l'accesso alle macromolecole.



Particelle porose di silice al microscopio elettronico.

Particelle core-shell

Struttura

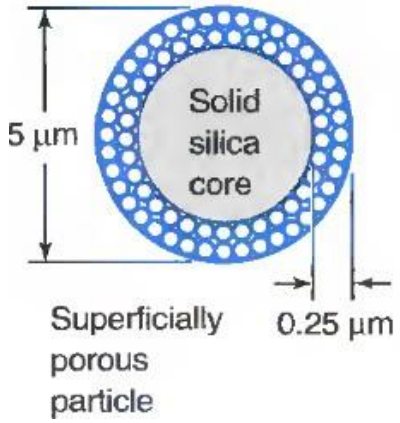
Un nucleo di silice non porosa circondato da un sottile guscio poroso, ad esempio 1,7 µm di nucleo e 0,5 µm di guscio.

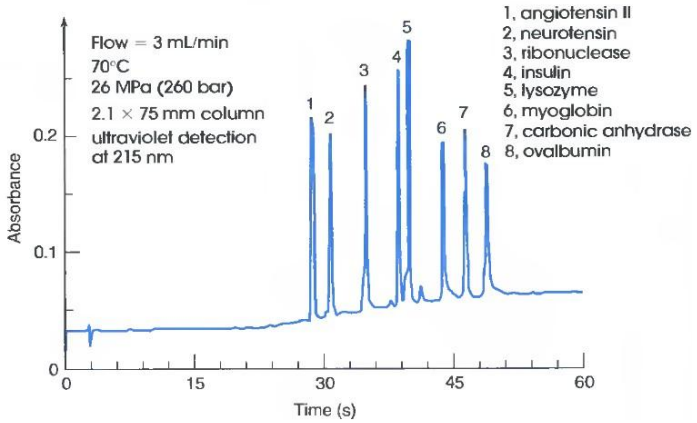
Perché sono efficienti

Il cammino diffusivo nel guscio è breve e riduce il termine C; la distribuzione granulometrica molto stretta riduce il termine A. Si ottengono efficienze vicine alle sub-2 µm con pressioni più contenute.

Applicazioni

Separazioni rapide di piccole molecole e di peptidi, compatibili anche con sistemi HPLC convenzionali.





Particella superficialmente porosa e separazione rapida di peptidi e proteine.

Van Deemter delle colonne moderne

Confronto

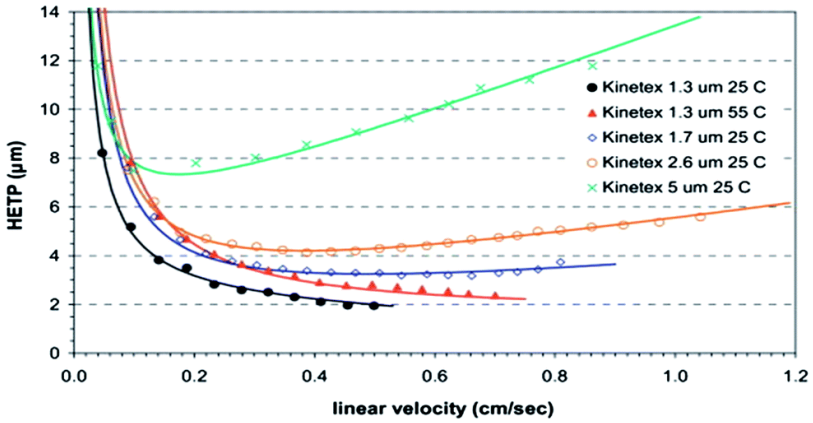
Le curve mostrano l'altezza del piatto in funzione della velocità lineare per particelle totalmente porose da 5 µm, core-shell e sub-2 µm.

Lettura del grafico

Con particelle piccole o core-shell il minimo è più basso e la curva sale meno al crescere della velocità: si può aumentare il flusso, accorciando l'analisi, quasi senza perdere efficienza.

Conseguenza

È questo appiattimento del termine C che ha reso possibili le analisi UHPLC di pochi minuti.



Curve di Van Deemter per diverse tipologie e dimensioni di particelle.

Colonne monolitiche

Struttura

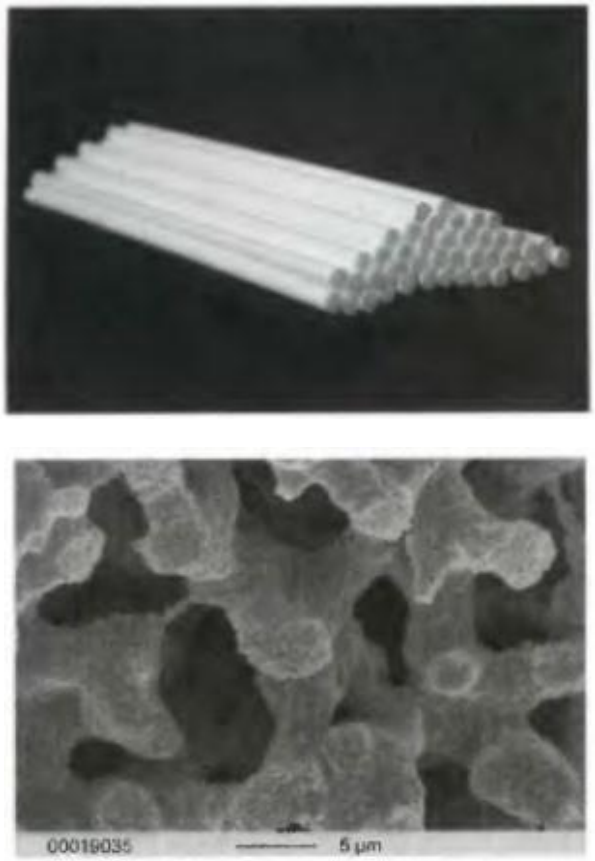
Una barra continua di silice porosa, ottenuta per polimerizzazione in situ. Circa l'80% del volume è vuoto, con macropori di circa 2 µm per il flusso e mesopori di circa 13 nm per la superficie.

Vantaggi

La struttura aperta abbatte la contropressione e consente flussi elevati con buona efficienza.

Limiti

Minore capacità e minore scelta di chimiche rispetto alle colonne impaccate: sono usate soprattutto per separazioni rapide e per biomolecole di grandi dimensioni.



Barre monolitiche e struttura porosa al microscopio elettronico.

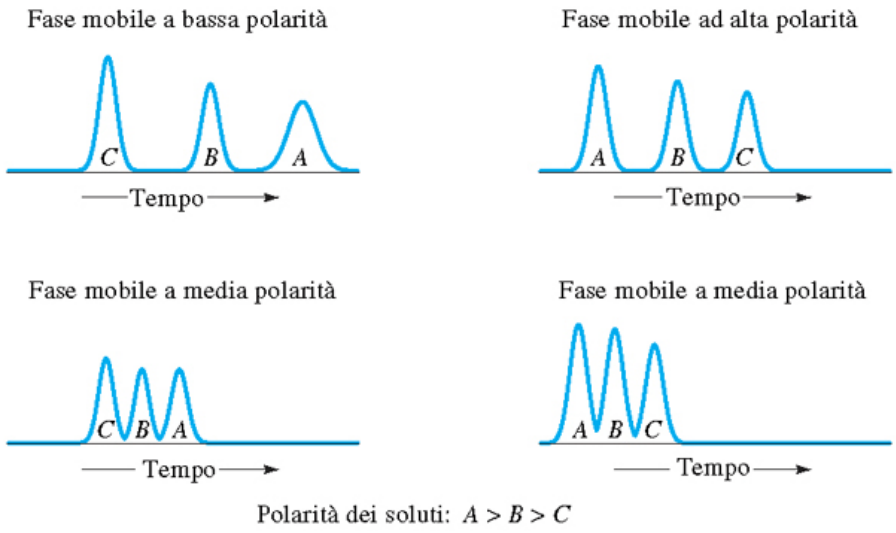
Fase diretta e fase inversa: ordine di eluizione

In fase diretta (NPC)

Eluiscono più tardi i composti più polari. Per ridurre i tempi di ritenzione si aumenta la polarità della fase mobile.

In fase inversa (RPC)

Eluiscono più tardi i composti meno polari. Per ridurre i tempi di ritenzione si diminuisce la polarità della fase mobile, cioè si aumenta la frazione di solvente organico.



Effetto della polarità della fase mobile in NPC e RPC (polarità dei soluti A > B > C).

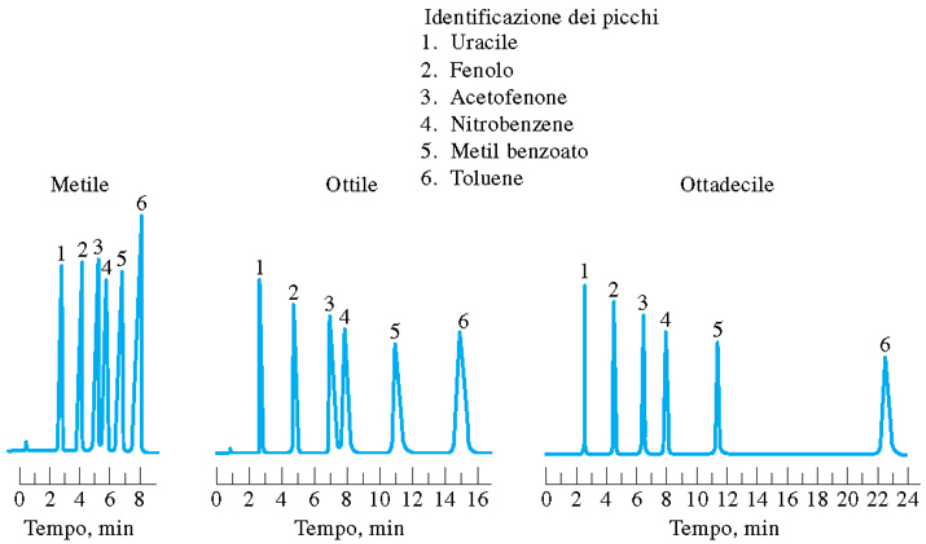
Effetto della fase stazionaria in fase inversa

Osservazione

Separando la stessa miscela su fasi C1, C8 e C18, all'aumentare della lunghezza della catena alchilica cresce la ritenzione dei composti meno polari.

Interpretazione

Una catena più lunga è più idrofoba e interagisce più fortemente con gli analiti apolari. La separazione migliora a scapito del tempo di analisi.



Separazione di uracile, fenolo, acetofenone, nitrobenzene, metil benzoato e toluene su C1, C8 e C18.

Effetto del modificatore organico

Esperimento

La stessa miscela è separata su C18 con acqua-metanolo al 24, 43, 63 e 82% di metanolo.

Risultato

Aumentando il metanolo la fase mobile diventa meno polare, la sua forza eluente cresce e tutti i tempi di ritenzione diminuiscono. Con troppo metanolo i picchi si avvicinano e la separazione si perde.

Ottimo

La condizione migliore è il 43% di metanolo, il miglior compromesso tra risoluzione e durata dell'analisi.

% Metanolo	Tempo di Ritenzione (min)				
	A	B	C	D	E
24	1.6	10.0	22.0	34.0	88.0
43	1.3	4.2	6.8	10.1	17.2
63	1.4	2.3	3.0	3.8	4.8
82	1.4	1.7	1.85	2.0	2.17

Tempi di ritenzione di cinque analiti a diverse percentuali di metanolo.

Eluizione isocratica e a gradiente

Isocratica

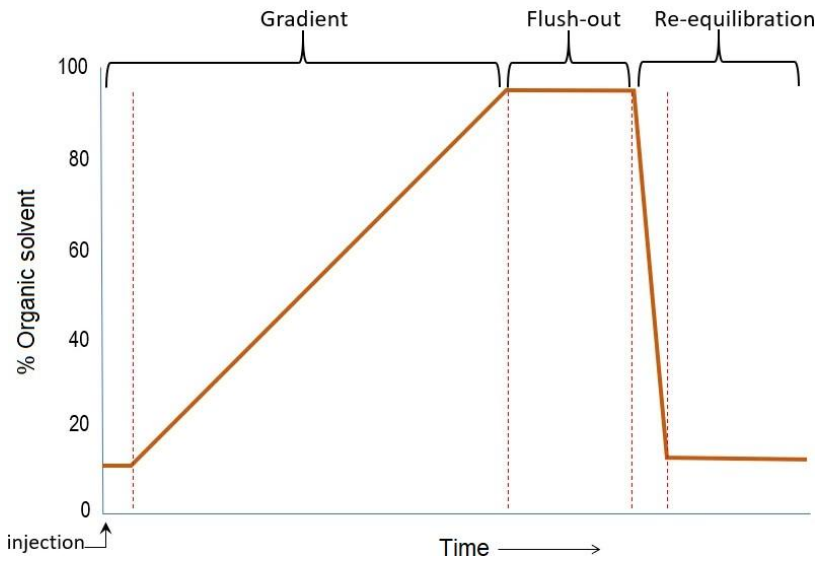
La composizione della fase mobile resta costante per tutta la corsa: semplice e riproducibile, adatta a pochi analiti di polarità simile.

A gradiente

La composizione varia durante la corsa: in fase inversa si aumenta progressivamente la frazione di solvente organico. I composti polari si separano all'inizio, quelli apolari vengono eluiti in tempi ragionevoli e con picchi stretti.

Ri-equilibrazione

Al termine si torna alle condizioni iniziali e si lascia equilibrare la colonna prima dell'iniezione successiva.



Profilo di gradiente con lavaggio finale e ri-equilibrazione.

Analiti ionizzabili e pH

In fase inversa la forma neutra di un analita è più trattenuta della forma ionica: controllando il pH della fase mobile si controllano ritenzione e forma dei picchi.

Acidi deboli

$HA \rightleftharpoons A^- + H^+$. A pH almeno 2 unità sotto il pK_a prevale la forma neutra HA, più trattenuta. Per gli acidi carbossilici si usa spesso acido formico allo 0,1%.

Basi deboli

$BH^+ \rightleftharpoons B + H^+$. A pH almeno 2 unità sopra il pK_a dell'acido coniugato BH^+ prevale la base neutra B.

Limiti della colonna

Le fasi legate su silice sono stabili tra pH 2 e 8: sotto si idrolizza il legame della fase, sopra si dissolve la silice. Le fasi ibride arrivano a pH 1-12.

HILIC e fasi mobili per LC-MS

HILIC

Fase stazionaria polare (silice, ammide, zwitterionica) con fase mobile ricca di acetonitrile. Un film d'acqua sulla superficie trattiene gli analiti polari, che in fase inversa uscirebbero al tempo morto.

Quando usarla

Zuccheri, amminoacidi, nucleotidi, metaboliti polari e acidi organici: è complementare alla fase inversa nella metabolomica.

Fasi mobili per LC-MS

Servono additivi volatili: acido formico, formiato e acetato di ammonio. I tamponi fosfato non sono compatibili con la sorgente dello spettrometro.

Biomolecole: SEC e scambio ionico

Taratura in SEC

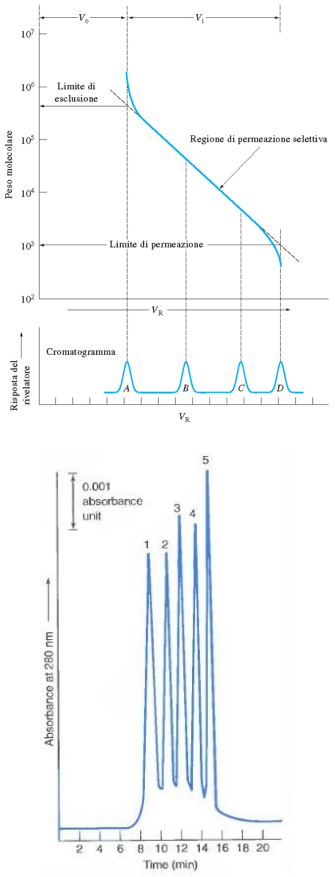
Il logaritmo della massa molare è circa lineare con il volume di eluizione tra il limite di esclusione e il limite di permeazione. Con standard noti si stima la massa di una proteina incognita.

Separazione di proteine

Enzimi di massa compresa tra 12 e 290 kDa sono separati in base alla dimensione; lo scambio ionico, invece, li separa per carica netta al pH della fase mobile.

Uso combinato

Affinità, scambio ionico e SEC si usano in sequenza nella purificazione di una proteina ricombinante.



Curva di taratura SEC e separazione di cinque enzimi (glutammato deidrogenasi, lattato deidrogenasi, enolasi, adenilato chinasi, citocromo c).

05

Gascromatografia

Separazione di composti volatili e termicamente stabili

Principio e strumento

Campo di applicazione

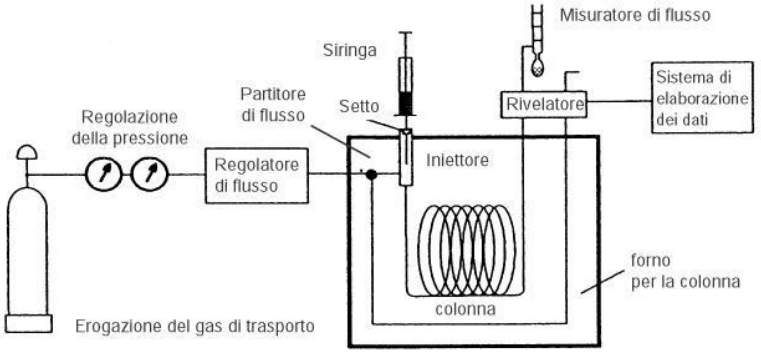
Analiti volatili e stabili alla temperatura dell'iniettore e del forno: solventi, aromi, pesticidi, acidi grassi, steroli e metaboliti derivatizzati.

Gas-liquido e gas-solido

Nella GC gas-liquido la fase stazionaria è un liquido legato alla parete e il meccanismo è di ripartizione. Nella gas-solido un adsorbente separa gas permanenti e idrocarburi leggeri.

Lo strumento

Bombola e regolatori del gas di trasporto, iniettore riscaldato, colonna nel forno termostatato, rivelatore e sistema di acquisizione dati.



Schema di un gascromatografo.

Gas di trasporto e iniezione

Gas di trasporto

Elio, idrogeno o azoto. L'idrogeno ha la curva di Van Deemter più piatta: mantiene l'efficienza a velocità elevate e accorcia le analisi. L'azoto ha il minimo più basso ma a velocità ridotte. Il termine B pesa molto più che in LC.

Split

Solo una frazione del campione vaporizzato entra in colonna, il resto viene scaricato. Si usa per campioni concentrati ed evita il sovraccarico.

Splitless

Quasi tutto il campione entra in colonna: è la modalità per l'analisi di tracce. Iniezioni on-column e PTV si usano per composti termolabili.

Colonne capillari e impaccate

Capillari

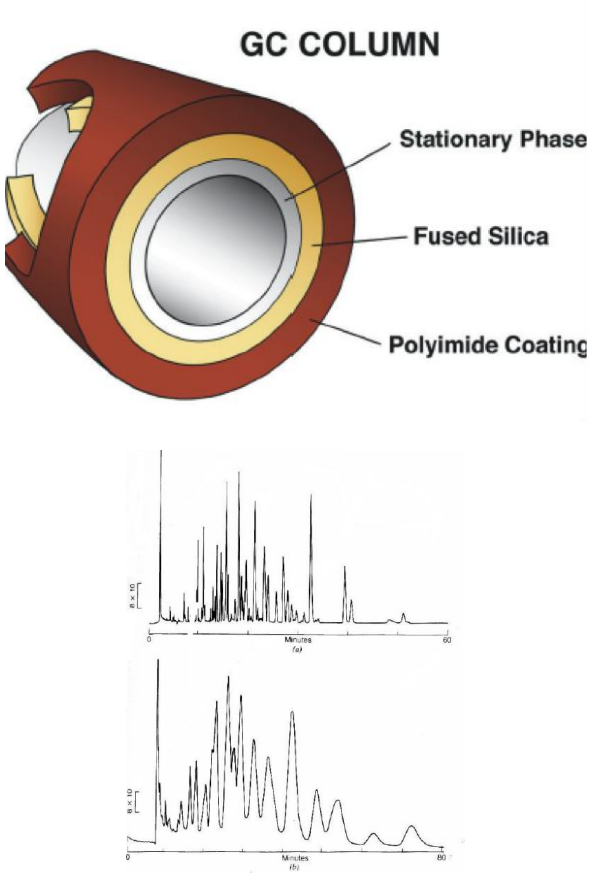
Tubi in silice fusa rivestiti esternamente di poliimmide, lunghi 15-60 m con diametro interno di 0,1-0,53 mm. Nelle WCOT la fase liquida è un film di 0,1-5 µm sulla parete; nelle PLOT è uno strato poroso adsorbente.

Impaccate

Supporto inerte ricoperto di fase liquida: maggiore capacità ma efficienza molto inferiore. Oggi sono limitate all'analisi di gas.

Il confronto

L'assenza del termine A e la lunghezza elevata danno alle capillari un numero di piatti enormemente superiore.



Sezione di una colonna capillare; la stessa miscela su capillare (in alto) e impaccata (in basso).

Fasi stazionarie e programmata di temperatura

Fasi stazionarie

Polidimetilsilossano (apolare), 5% fenil-polisilossano (la più usata), cianopropil-polisilossani (polari, per isomeri degli acidi grassi), polietilenglicole o WAX (molto polare). Vale la regola «il simile scioglie il simile».

Limiti termici

Ogni fase ha una temperatura massima: oltre, la fase si degrada e rilascia frammenti (column bleed) che alzano la linea di base.

Programmata di temperatura

Aumentare la temperatura del forno durante la corsa è l'equivalente del gradiente in LC: i composti volatili si separano a bassa temperatura e quelli altobollenti escono come picchi stretti.

Identificazione e derivatizzazione

$$I = 100 \left[n + (\log t'_{R,x} - \log t'_{R,n}) / (\log t'_{R,n+1} - \log t'_{R,n}) \right]$$

Indice di Kováts

Esprime la ritenzione di un analita rispetto a una serie di n-alcani, a cui si assegna 100 volte il numero di atomi di carbonio. È molto più trasferibile tra strumenti del solo tempo di ritenzione.

Perché derivatizzare

Gruppi -OH, -COOH, $-NH_2$ rendono gli analiti poco volatili e causano picchi con coda. La derivatizzazione li maschera.

Reazioni tipiche

Sililazione con BSTFA o MSTFA (steroli, zuccheri), metilazione degli acidi grassi a FAME, derivatizzazione degli acidi grassi a catena corta. Spazio di testa e SPME: modulo sulle estrazioni.

Esercizio svolto: indice di Kováts

Dati Colonna 5% fenil-polisilossano, isoterma. t_M = 1,0 min. Decano (C10): t_R = 9,0 min. Undecano (C11): t_R = 15,0 min. Analita X: t_R = 12,0 min.

t'_R	Decano 8,0 min Undecano 14,0 min X 11,0 min
log	log 8,0 = 0,903 log 14,0 = 1,146 log 11,0 = 1,041
I	$I = 100\,[10 + (1{,}041 - 0{,}903) / (1{,}146 - 0{,}903)] = 100\,(10 + 0{,}57) \approx 1057$

Conclusione L'indice 1057 si confronta con i valori di letteratura per la stessa fase stazionaria: insieme allo spettro di massa rende l'identificazione molto più affidabile.

Rivelatori: panoramica

Rivelatore	Tecnica	Risponde a	Note
FID	GC	Composti con legami C-H	Il più diffuso; distruttivo
TCD	GC	Tutti i composti	Universale, poco sensibile
ECD	GC	Alogenati, nitroderivati	Molto sensibile; sorgente ^{63}Ni
UV-Vis / DAD	LC	Composti con cromofori	Il più usato in HPLC; spettri con DAD
Fluorescenza	LC	Composti fluorescenti	Molto sensibile; derivatizzazione
Indice di rifrazione	LC	Tutti (zuccheri)	Poco sensibile; no gradiente
Spettrometria di massa	GC e LC	Ioni in base a m/z	Informazione strutturale

I rivelatori saranno approfonditi nelle lezioni successive; la spettrometria di massa avrà una lezione dedicata.

SINTESI

Quale tecnica cromatografica?

Volatile e termicamente stabile?	**GC (eventualmente dopo derivatizzazione)**
Molecola piccola, da apolare a mediamente polare?	**HPLC in fase inversa (C18)**
Molto polare (zuccheri, amminoacidi, metaboliti)?	**HILIC o scambio ionico**
Ione o molecola carica?	**Scambio ionico**
Macromolecola da separare per dimensione?	**Esclusione dimensionale**
Proteina con tag o anticorpo?	**Affinità (IMAC, Proteina A)**
Screening rapido e poco costoso?	**TLC**

SINTESI

GC e HPLC a confronto

	GC	HPLC
Fase mobile	Gas inerte, non interagisce	Liquido, partecipa alla selettività
Analiti	Volatili, termostabili	Non volatili, anche termolabili e macromolecole
Efficienza tipica	> 100.000 piatti (capillari)	10.000-50.000 piatti
Leva principale su k	Temperatura del forno	Composizione della fase mobile
Preparazione	Spesso derivatizzazione	Spesso diretta
Accoppiamento MS	EI, spettri in libreria	ESI, ideale per biomolecole

Le due tecniche sono complementari: la scelta dipende dalla volatilità e dalla stabilità dell'analita, non dalla preferenza per uno strumento.