

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TERAMO

CL in VITICOLTURA ED ENOLOGIA

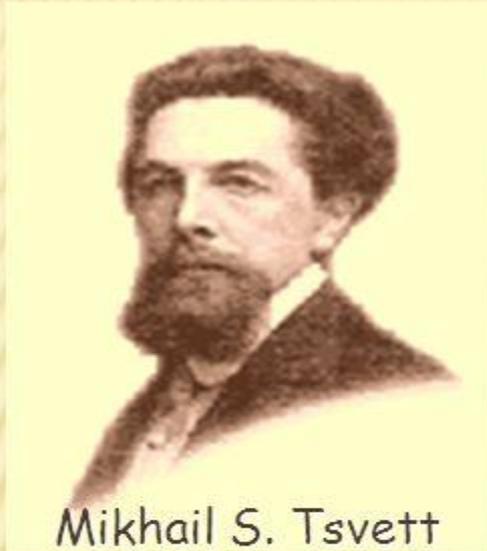
Anno Accademico 2021/2022

METODI
CROMATOGRAFICI

Chromatography is a mature technique now.



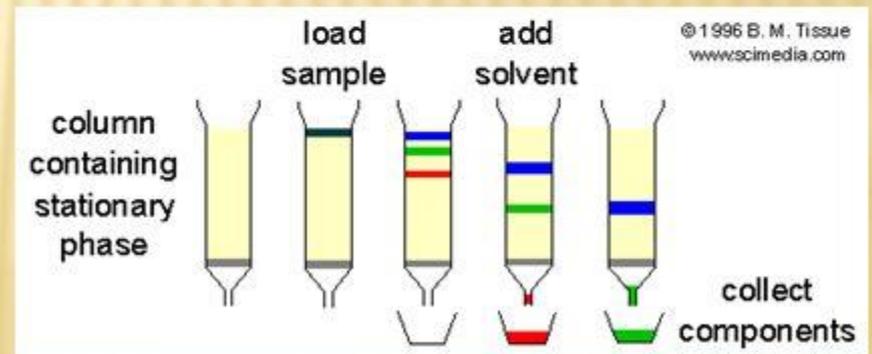
LA CROMATOGRAFIA



Mikhail S. Tsvett

- ✘ 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 liquida: Dal 1906 ad oggi



La miscela di pigmenti,
prima di aggiungere
l'eluente

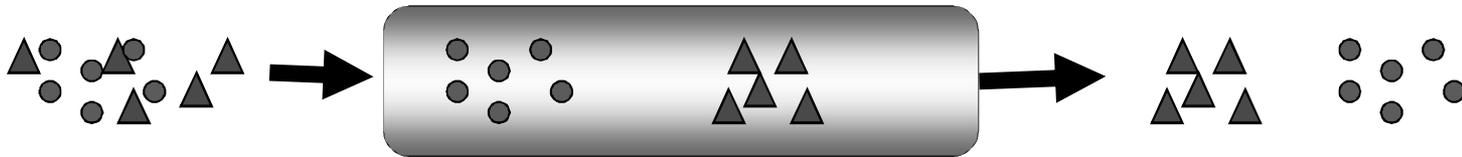


Dopo aver aggiunto l'eluente,
i componenti della miscela si
sono separati.



Cromatografia

Il termine cromatografia indica un insieme di tecniche che hanno lo scopo di separare una miscela nei suoi componenti, per permetterne il riconoscimento qualitativo e quantitativo.



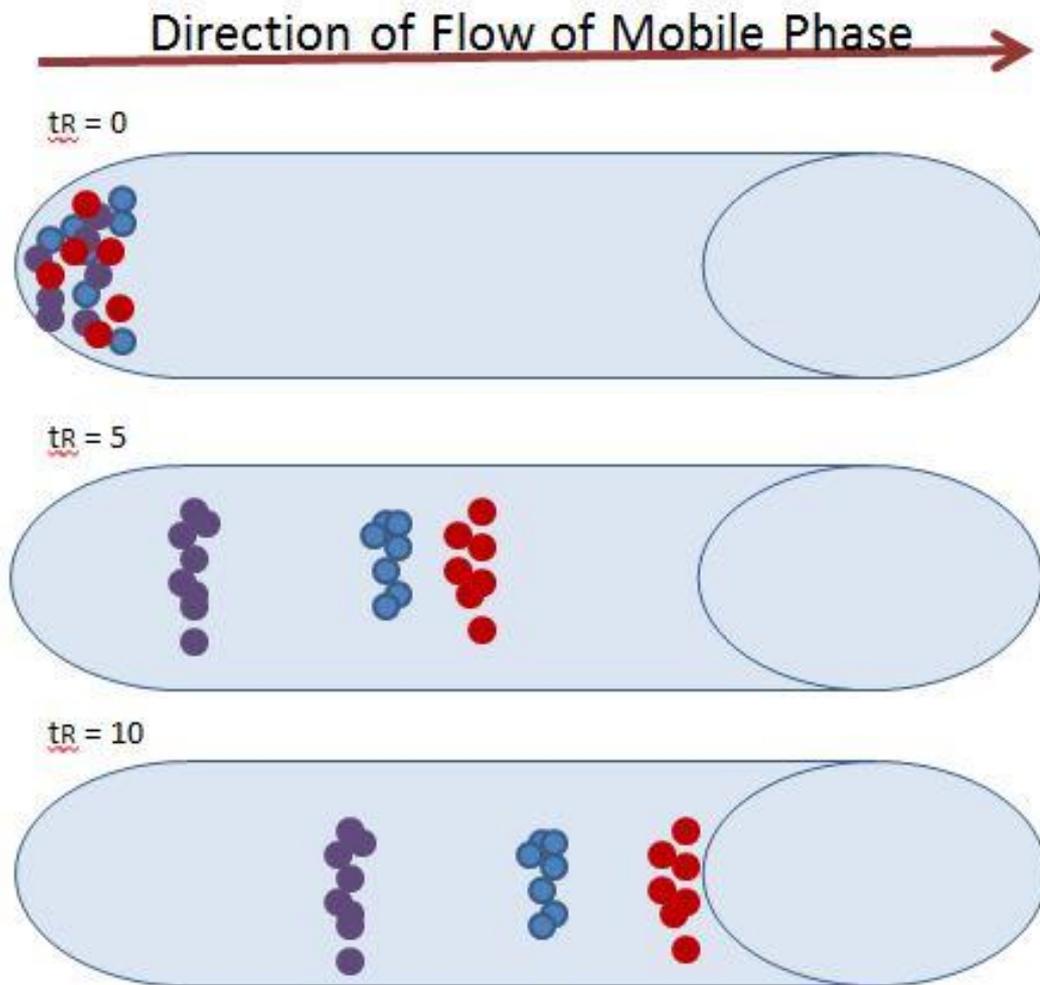
Cromatografia di Adsorbimento

Cromatografia di ripartizione

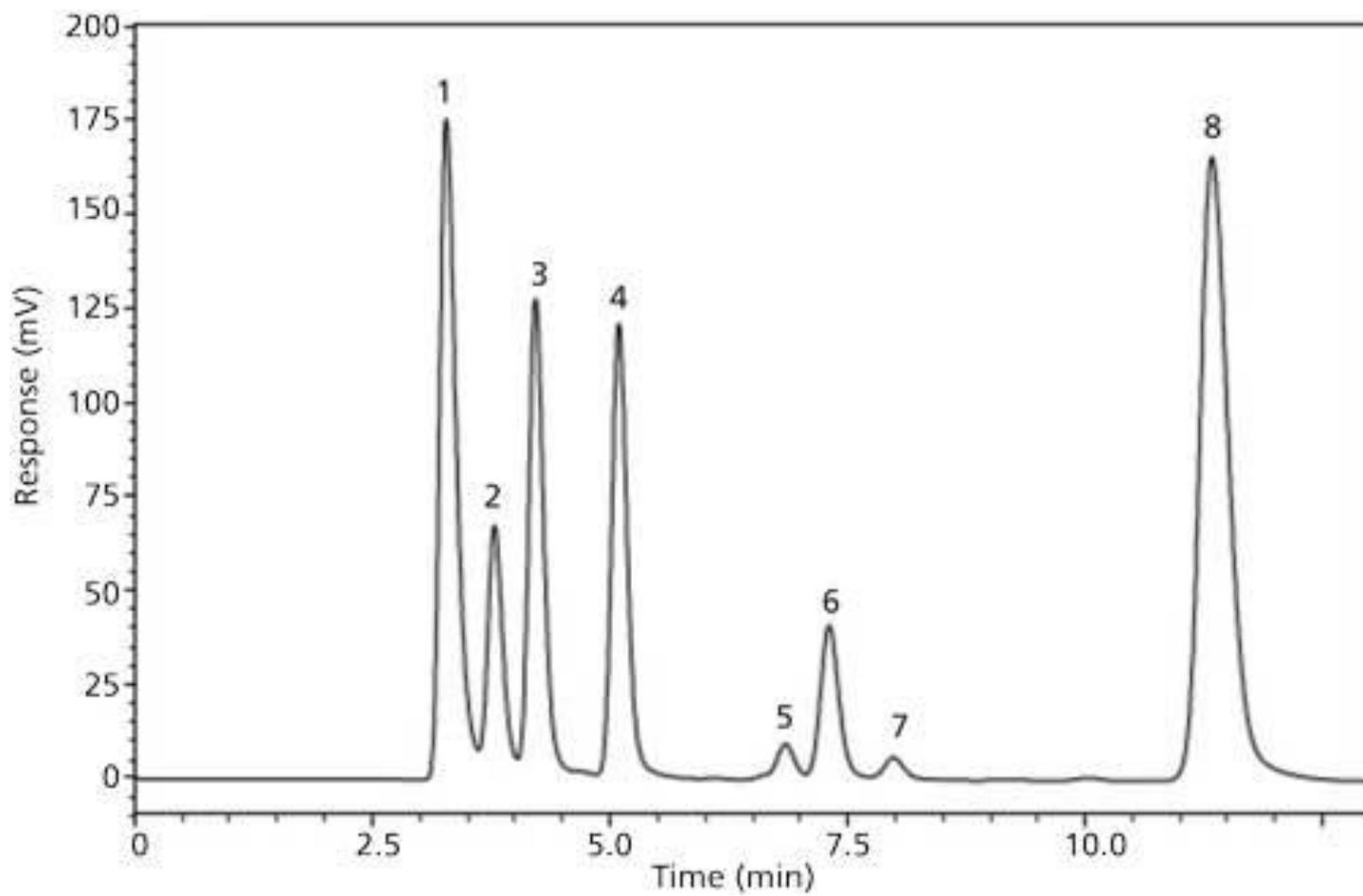
Cromatografia di esclusione
dimensionale

Cromatografia a scambio ionico

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**.

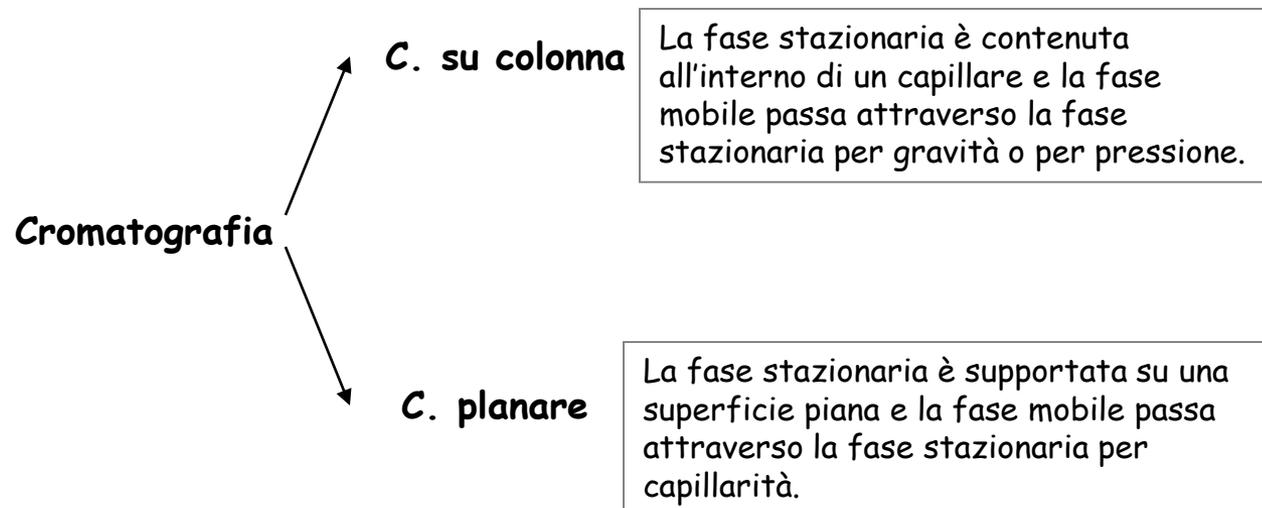
I componenti sono trasportati lungo la fase stazionaria dal flusso della fase mobile (**Eluizione**).

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

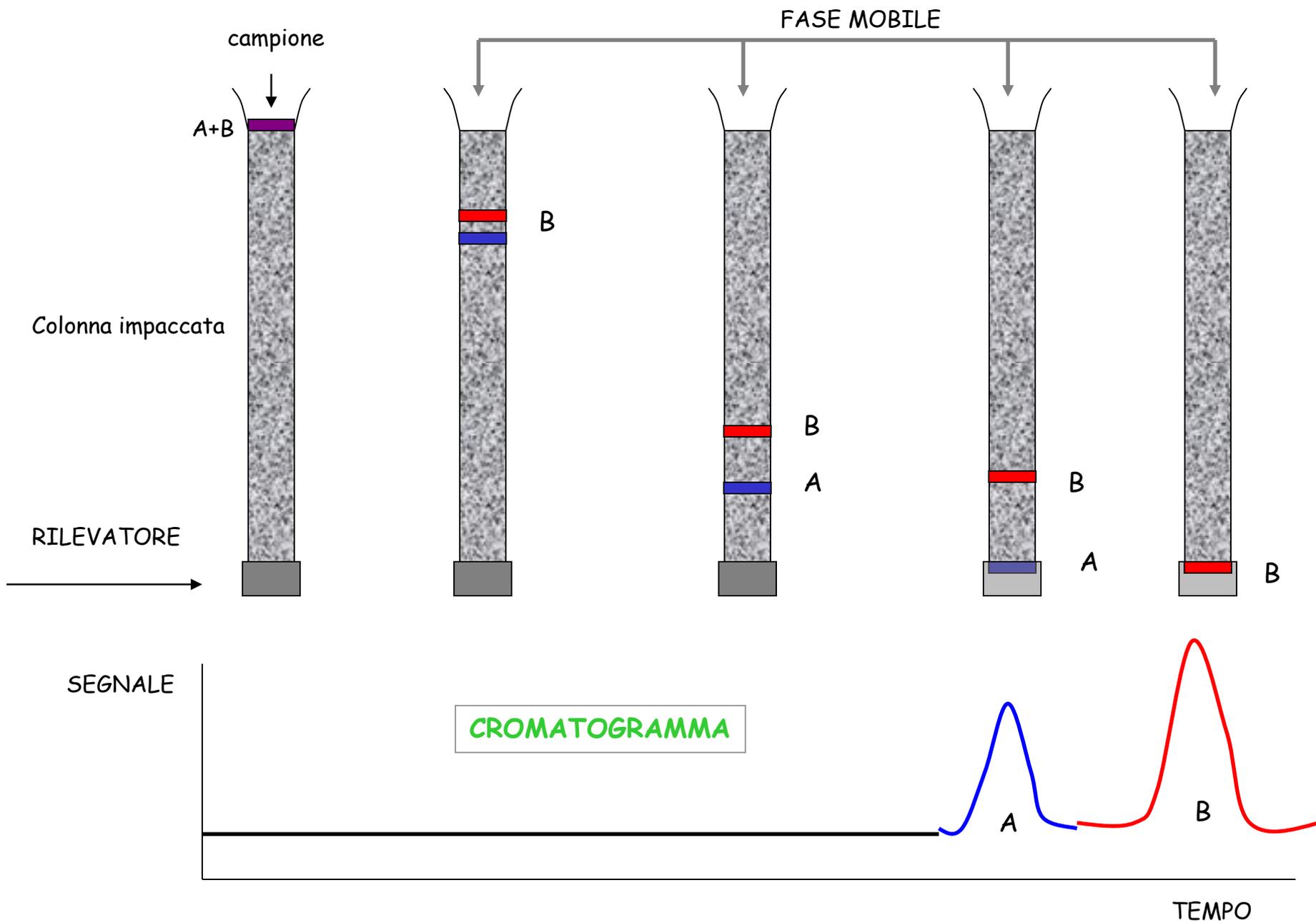
Fase stazionaria: fase fissa in una determinata posizione (o colonna o superficie planare)

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

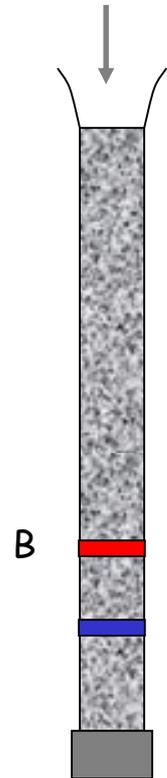
Classificazione



Cromatografia di eluizione



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)**.

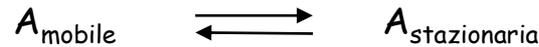
La ripartizione di un soluto tra fase stazionaria e fase mobile determina quindi i tempi di eluizione, e la possibilità di separare miscele complesse.

Velocità di migrazione dei soluti

Dalla velocità relativa di 2 o più molecole da separare dipende l'efficacia della colonna

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

Rapporto di ripartizione o **coefficiente di ripartizione**



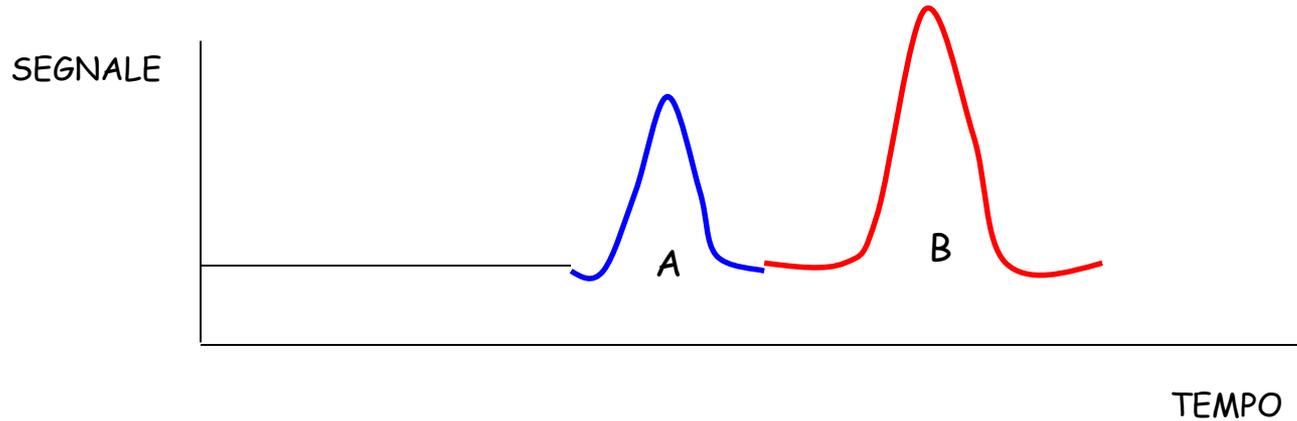
$$K = C_S / C_M$$



$$C_S = K C_M$$

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

CROMATOGRAMMA



Informazioni QUALITATIVE
Informazioni QUANTITATIVE

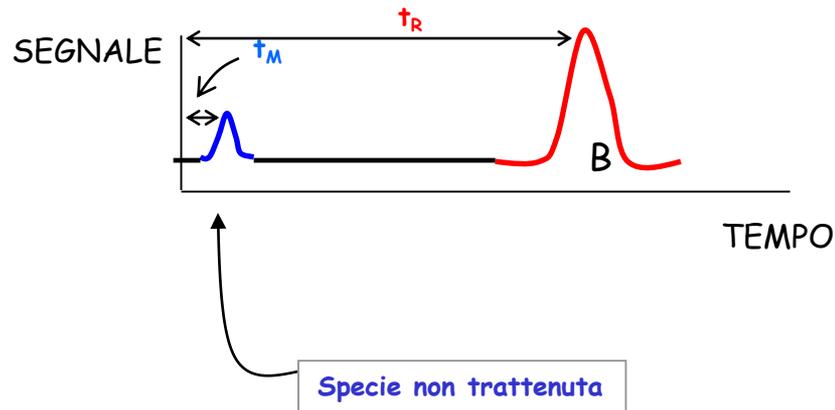
POSIZIONE DEI PICCHI

DIMENSIONI (ALTEZZA E AREA) DEI PICCHI



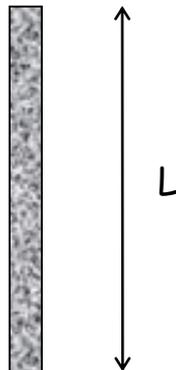
NECESSITA' DI AVERE PICCHI BEN DEFINITI

Tempo morto e tempo di ritenzione



t_M : tempo necessario ad una specie non trattenuta per attraversare una colonna

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

$$v = L / T_R$$

$$u = L / T_M$$

Coefficiente di ripartizione e velocità di migrazione

$$K_A = C_S / C_M$$

$V = u \times$ frazione di tempo che il soluto trascorre in FM



$v = u \times$ numero di moli di soluto in fase mobile / numero di moli totali di soluto

$$v = u \times \frac{C_M V_M}{C_M V_M + C_S V_S} = u \times \frac{1}{1 + C_S V_S / C_M V_M}$$

$$C_S = K_A C_M$$

$$v = u \times \frac{1}{1 + K_A V_S / V_M}$$

Fattore di capacità, indice della velocità di migrazione del soluto

➤ Parametro che può essere calcolato *sperimentalmente*

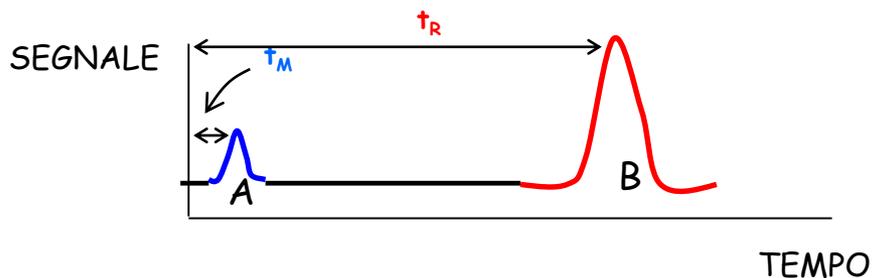
$$k'_A = \frac{K_A V_S}{V_M}$$

$$v = u \times \frac{1}{1 + K_A V_S / V_M}$$

$$v = u \times \frac{1}{1 + k'_A} \rightarrow L/T_R = L/T_M \times \frac{1}{1 + k'_A}$$

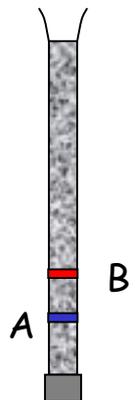
$$k'_A = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

$$k'_A > 1!$$



Fattore di selettività, indice della velocità di migrazione relativa di due soluti

➤ Parametro che può essere calcolato *sperimentalmente*



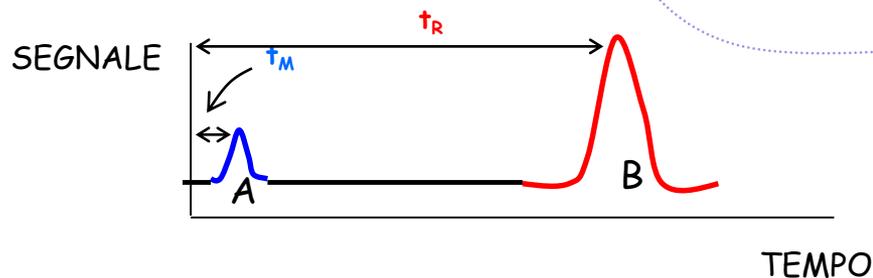
$$\alpha = \frac{K_B}{K_A} \longrightarrow \alpha > 1 \longrightarrow \alpha = \frac{(t_R)_B - t_M}{(t_R)_A - t_M}$$

$$K'_B = \frac{K_B V_S}{V_M}$$

$$K'_A = \frac{K_A V_S}{V_M}$$

$$K'_B = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

$$K'_A = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$



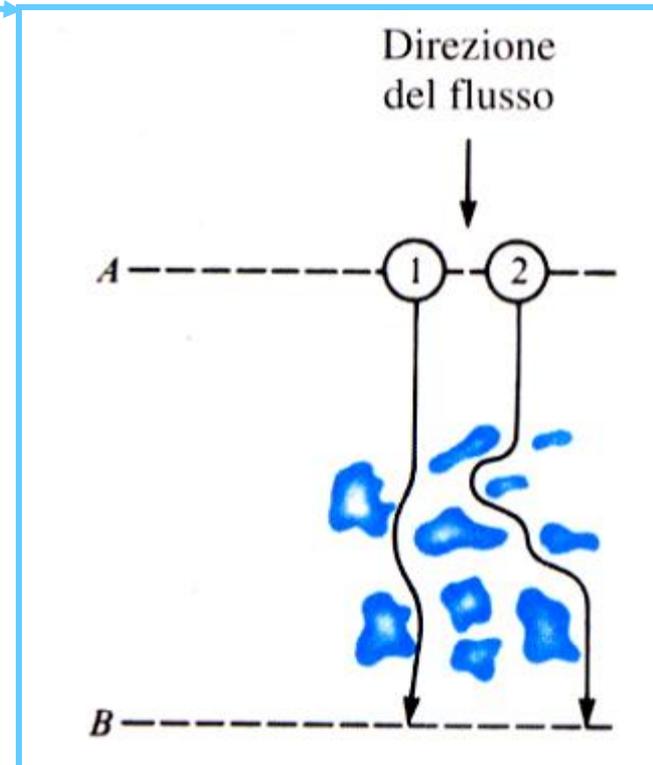
Le molecole di un analita non si muovono lungo la colonna con la stessa velocità: la loro dispersione ha generalmente un profilo Gaussiano. Il centro del profilo (banda di eluizione) rappresenta la velocità media.

I fattori che provocano deviazioni dal valore medio sono:

1. **diffusione longitudinale** (diffusione delle molecole dalla zona a maggiore concentrazione a quella a minore in direzione parallela all'asse della colonna);
2. **percorsi multipli**;

Figura 26-5

Percorsi tipici di due molecole durante l'eluizione. Si noti che la distanza percorsa dalla molecola 2 è maggiore di quella della molecola 1, per cui la molecola 2 arriverà in B più tardi che la molecola 1.



3. **trasferimento di massa** tra fase mobile e fase stazionaria.

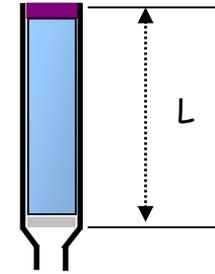
Efficienza di una colonna cromatografica

Altezza di un piatto teorico H

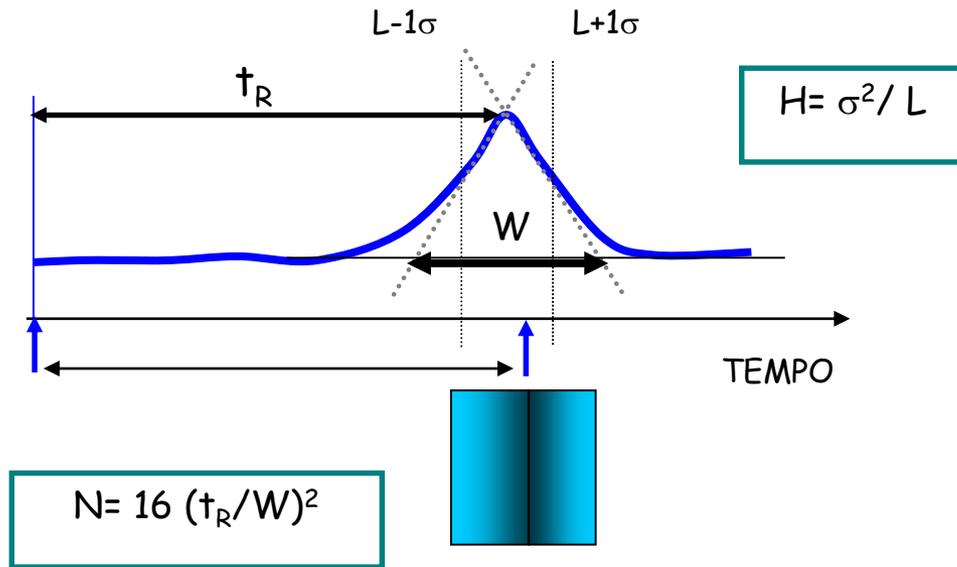
Numero di un piatti teorici N



$$N=L/H$$

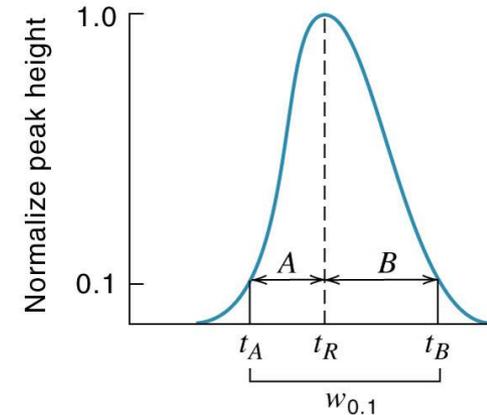


L'efficienza di una colonna è proporzionale ad N , quindi **inversamente** proporzionale **all'altezza** di un piatto.



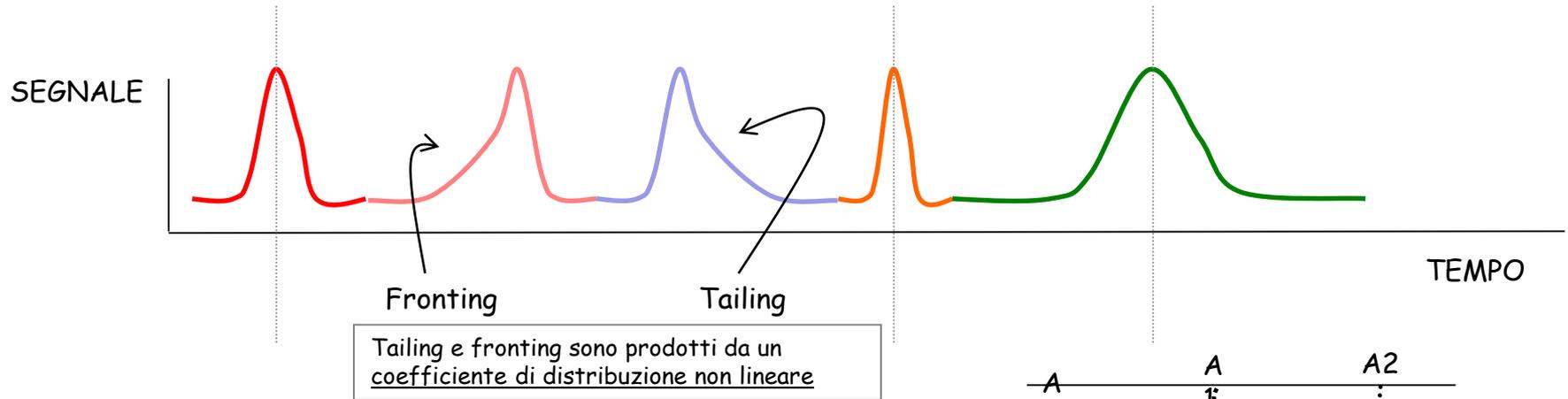
Intensità di colore = numero di molecole di analita

Picco asimmetrico (tailing)

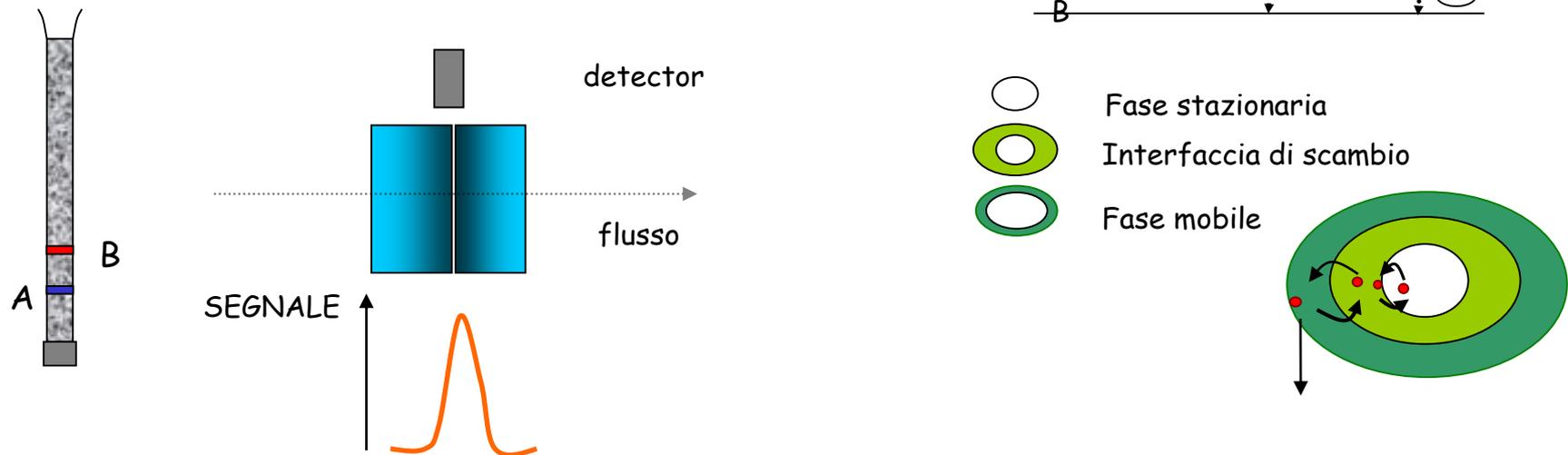


$$N = 41.7(t_R/w_{0.1})^2 / (A/B + 1.25)$$

Geometria del picco e efficienza della colonna



variazione di geometria del picco



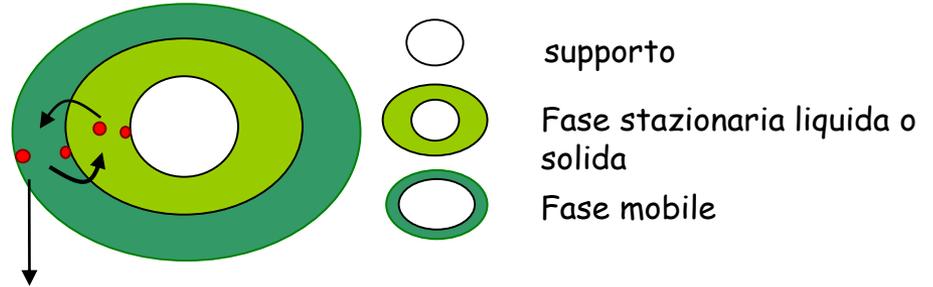
considerando che una molecola è capace di effettuare migliaia di trasferimenti fase mobile-fase stazionaria possiamo immaginare il picco come centrato sul valore effettivo di t_R attorno al quale c'è una distribuzione di errori "casuali" di percorso

Teoria dell'allargamento della banda; equazione di Van Deemter

$$H = B/u + C_S u + C_M u$$

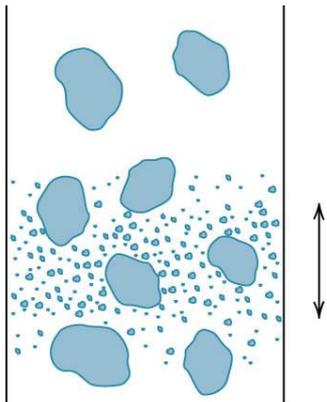
Coefficiente di **trasferimento di massa** nella fase stazionaria:
Film di liquido su particella solida - direttamente proporzionale a (spessore)², inversamente proporzionale a D_S nel film
Fase stazionaria solida - direttamente proporzionale al tempo adsorbimento/desorbimento

Diffusione longitudinale:
direttamente proporzionale al coefficiente di diffusione più importante in GC che in LC



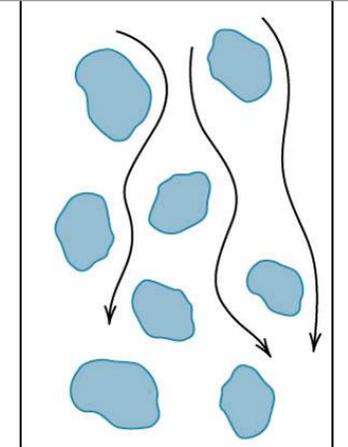
Coefficiente di **trasferimento di massa** nella fase mobile:
inv. prop. a D_M , funzione di (diametro particelle)² (diametro colonna)² e u

Diffusione turbolenta



Molecular diffusion

La diffusione turbolenta diminuisce a flussi bassi di fase mobile
L'allargamento di banda può essere minimizzato dall'utilizzo di particelle piccole e regolari (p.es. sfere)

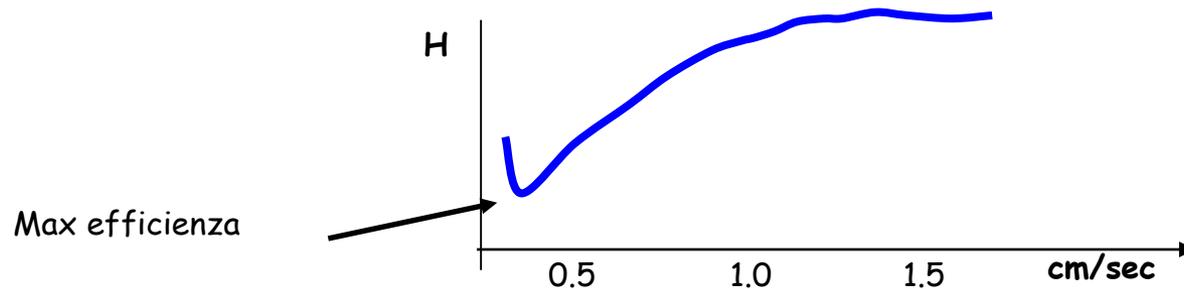


Eddy diffusion

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

PARAMETRI DI UNA COLONNA CROMATOGRAFICA

- Fattore di Capacità

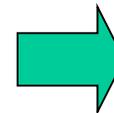
$$k'_A = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

- Selettività

$$\alpha = \frac{K_B}{K_A}$$

- Efficienza

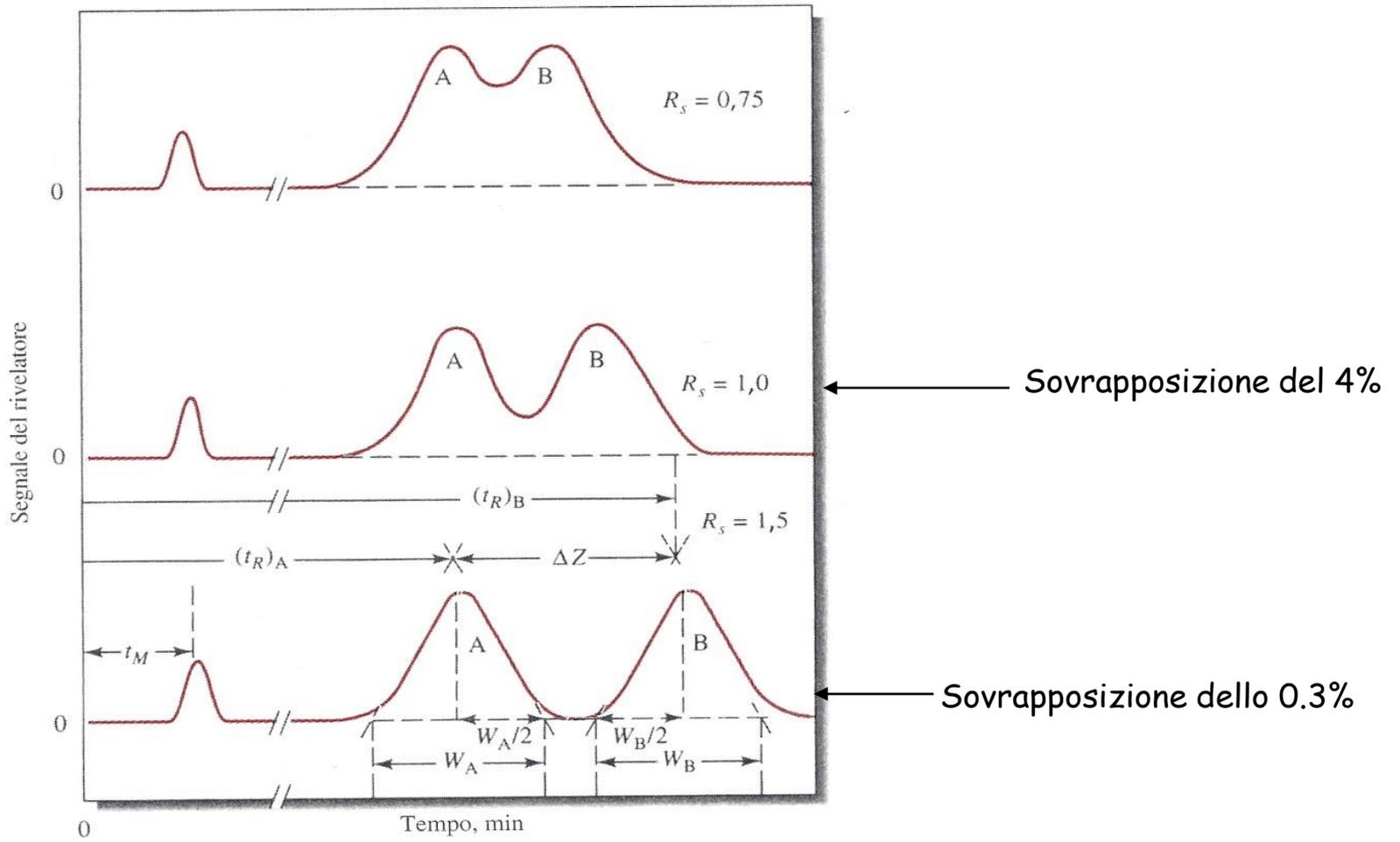
$$H = \sigma^2 / L$$



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

Risoluzione di una colonna

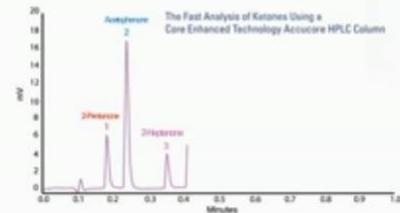
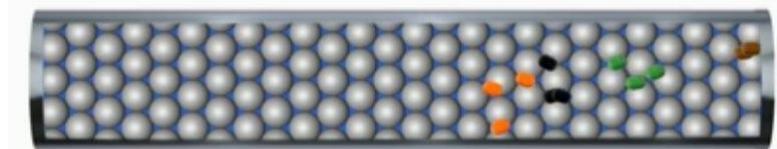
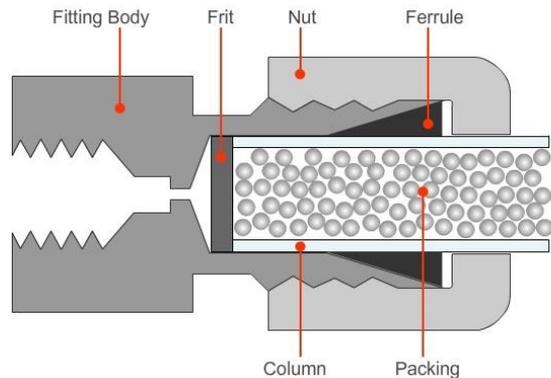
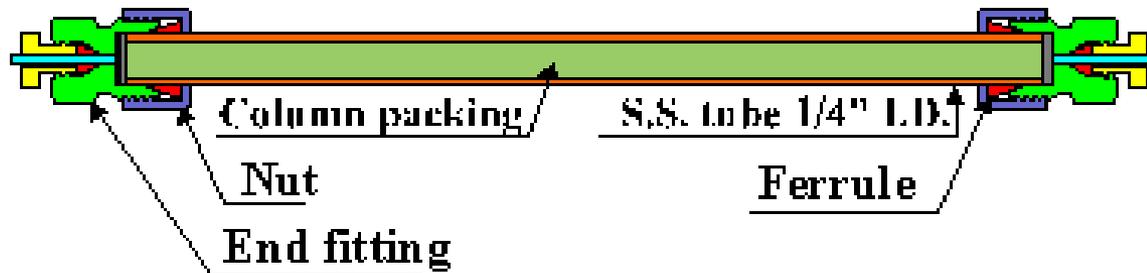
$$R_s = \frac{2 \Delta Z}{W_A + W_B} = \frac{2[(t_R)_B - (t_R)_A]}{W_A + W_B}$$



Classificazione generale	Metodo specifico	Fase stazionaria	Tipo di equilibrio
Cromatografia liquida (LC), fase mobile: liquido	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
Gas-cromatografia, Fase mobile: gas	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

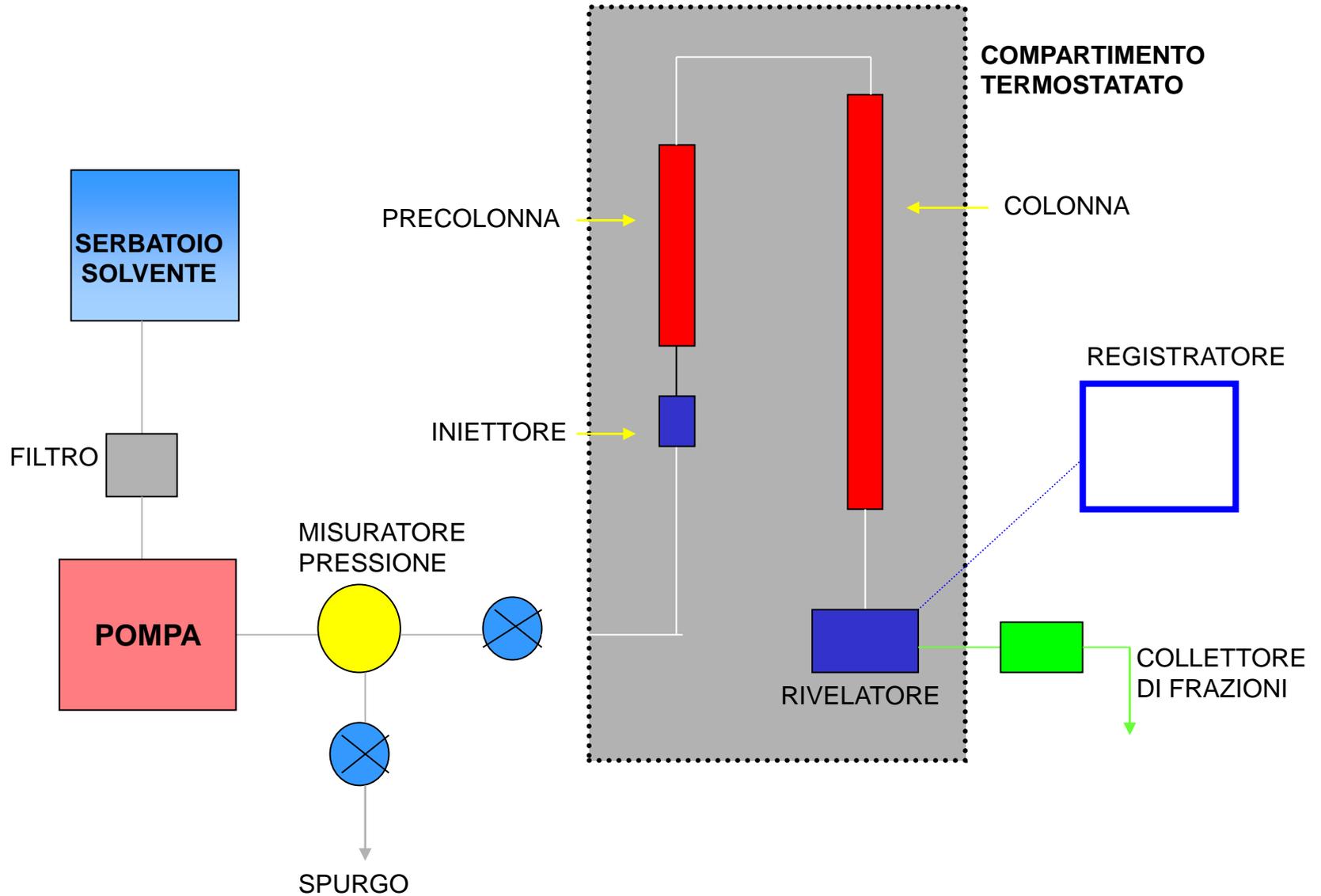
COLONNE IMPACCATE PER HPLC

Standart column hardware



Retention Time	Compound
0.18 mins	2-Pentanone
0.24 mins	Acetophenone
0.35 mins	2-Heptanone
0.39, 19 mins	Butyrophenone
0.39, 19 mins	Hexanophenone
0.39, 19 mins	Octanophenone
0.39, 19 mins	Decanophenone

SCHEMA DI CROMATOGRAFO HPLC



He, Ar, N₂, H₂

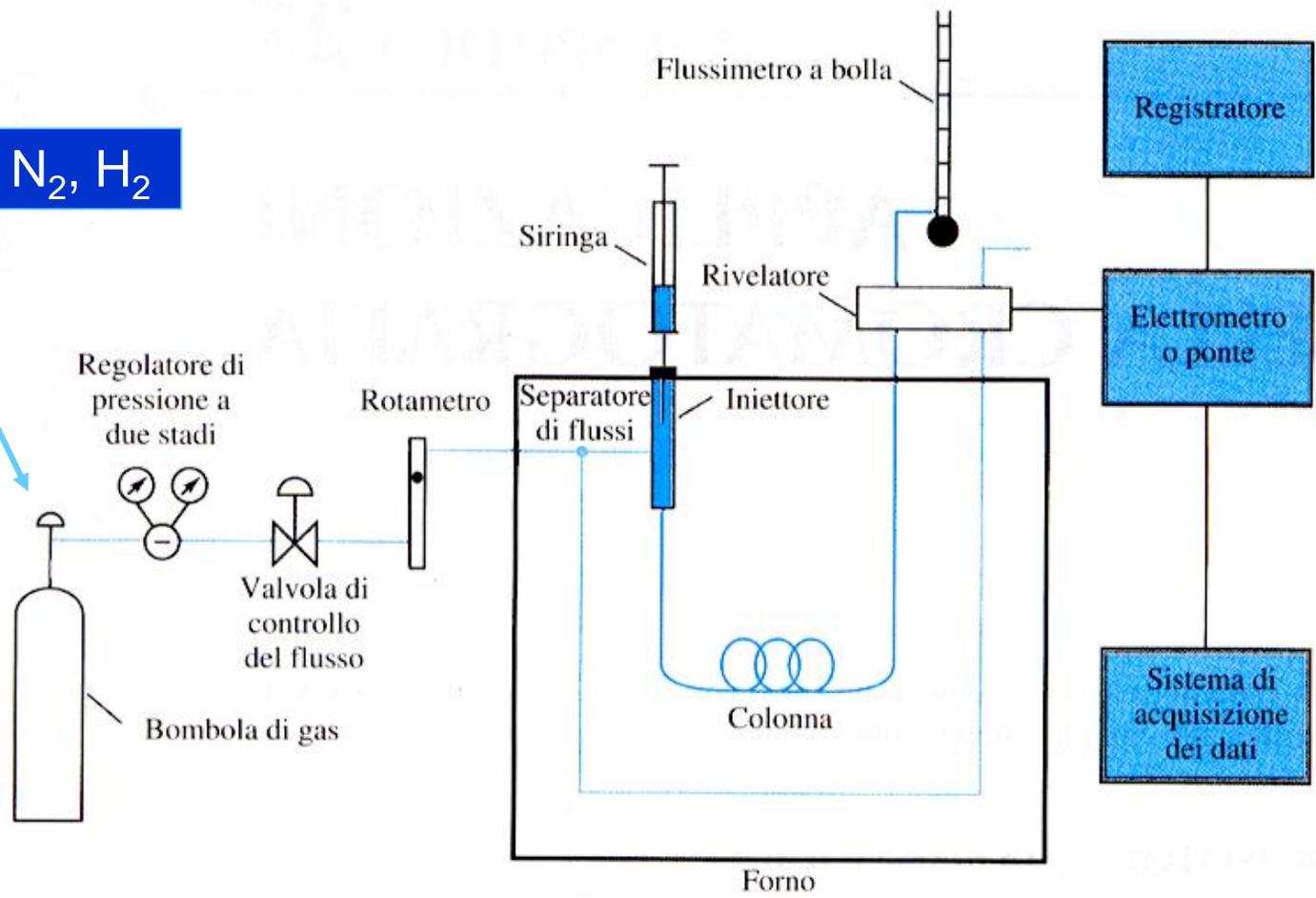
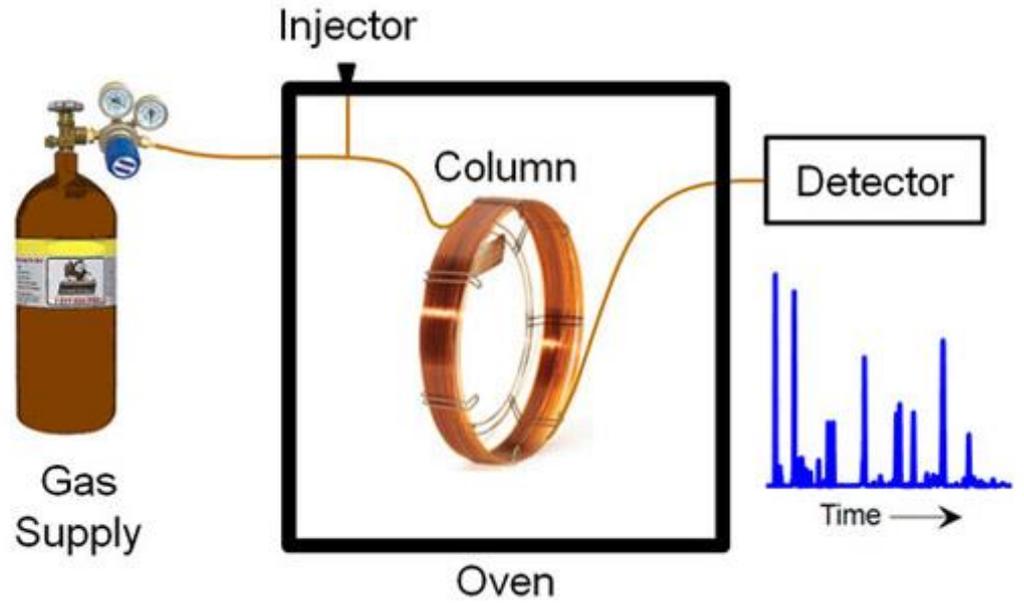


Figura 27-1
Schema di un gascromatografo.

GC



HPLC



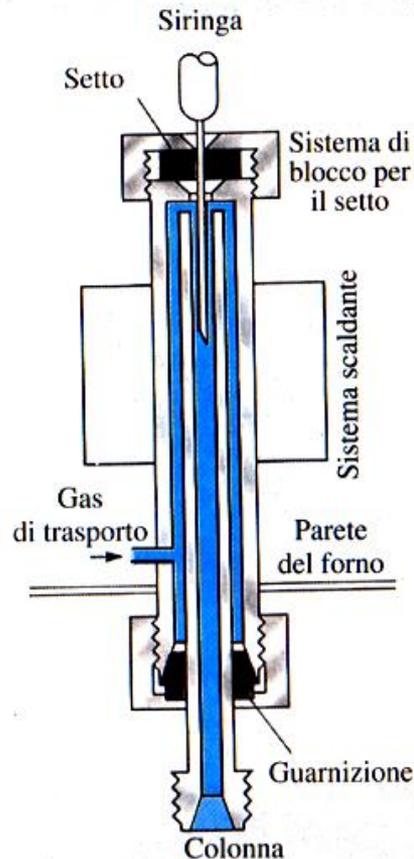


Figura 27-4

Sistema di iniezione riscaldato. (Da H. H. Willard, L. L. Merritt, J. A. Dean e F. A. Settle, *Instrumental Methods of Analysis*, VII ed., p. 542. Per gent. conc. della Belmont CA: Wadsworth, 1988).

Iniezione ed iniettori

Il campione viene iniettato in quantità molto piccole (fino a 0,5 ml per impaccate, fino a 100 volte inf. per capillari). L'entrata deve essere ad una temperatura sufficientemente elevata da permettere l'evaporazione istantanea del campione e abbastanza grande da permettere al vapore di espandersi senza essere spinto indietro.

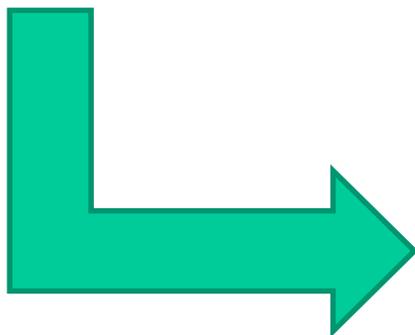
Colonne gascromatografiche

Si suddividono in impaccate e capillari.

Le impaccate contengono particelle solide che vengono impaccate: diatomee o diatomee silanizzate, per ridurre la polarità mediante arricchimento superficiale di gruppi metilici.

Le capillari sono tubi molto più sottili e lunghi (diametro = 0.2-0.5 mm; lunghezza = 20-100 m) in cui la fase stazionaria è depositata sulle pareti interne. Queste ultime hanno un elevato numero di piatti teorici (anche 300.000) grazie alla loro elevata lunghezza.

COLONNE CAPILLARI PER GC



GC COLUMN

