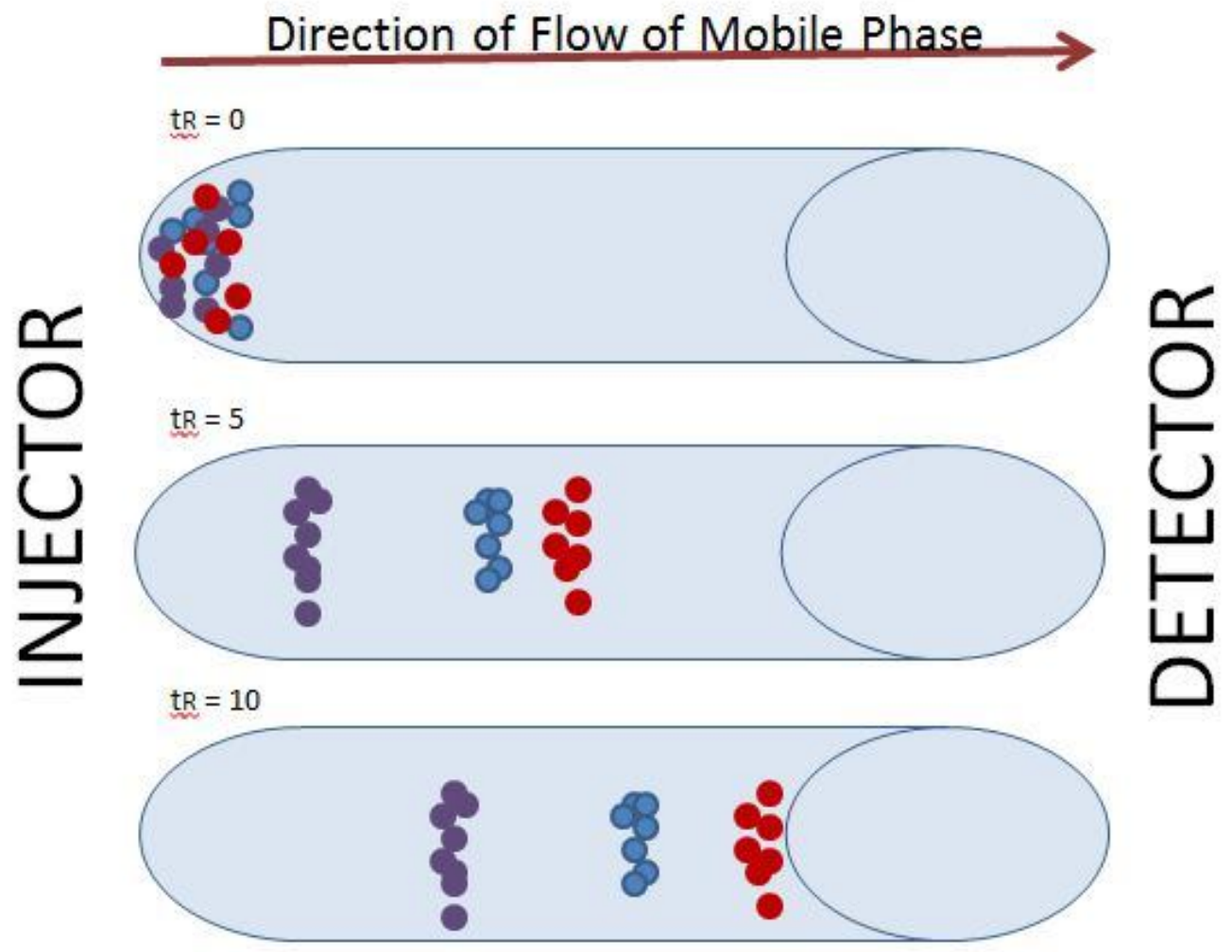
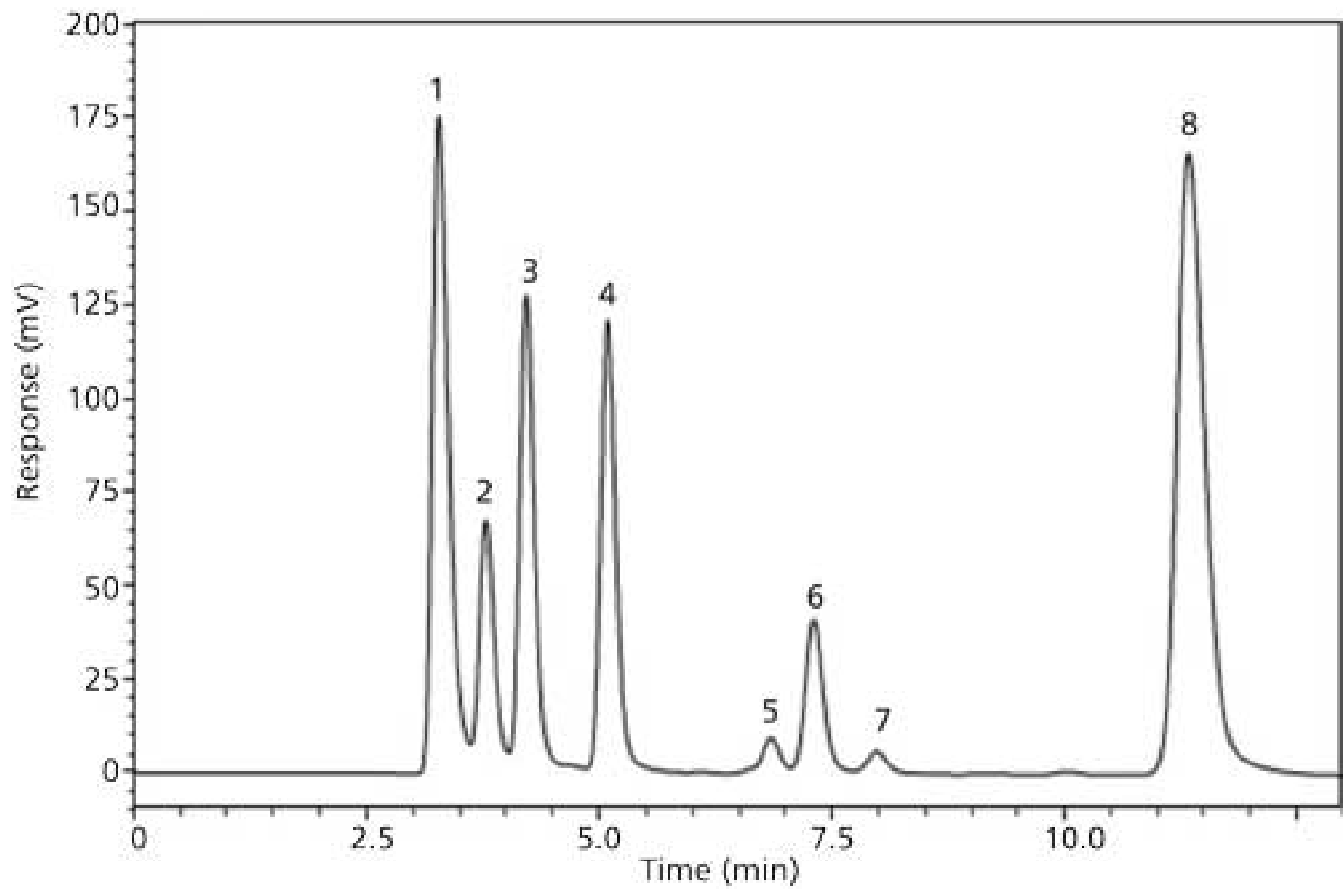


Chromatography is a mature technique now.







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**.

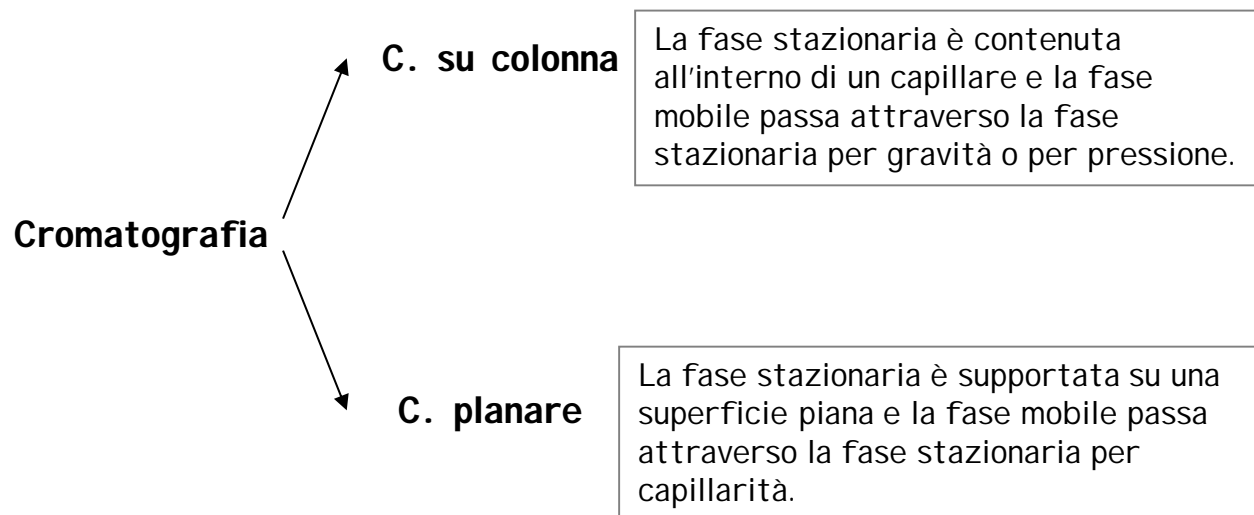
I componenti sono trasportati lungo la fase stazionaria dal flusso della fase mobile (**Eluizione**).

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

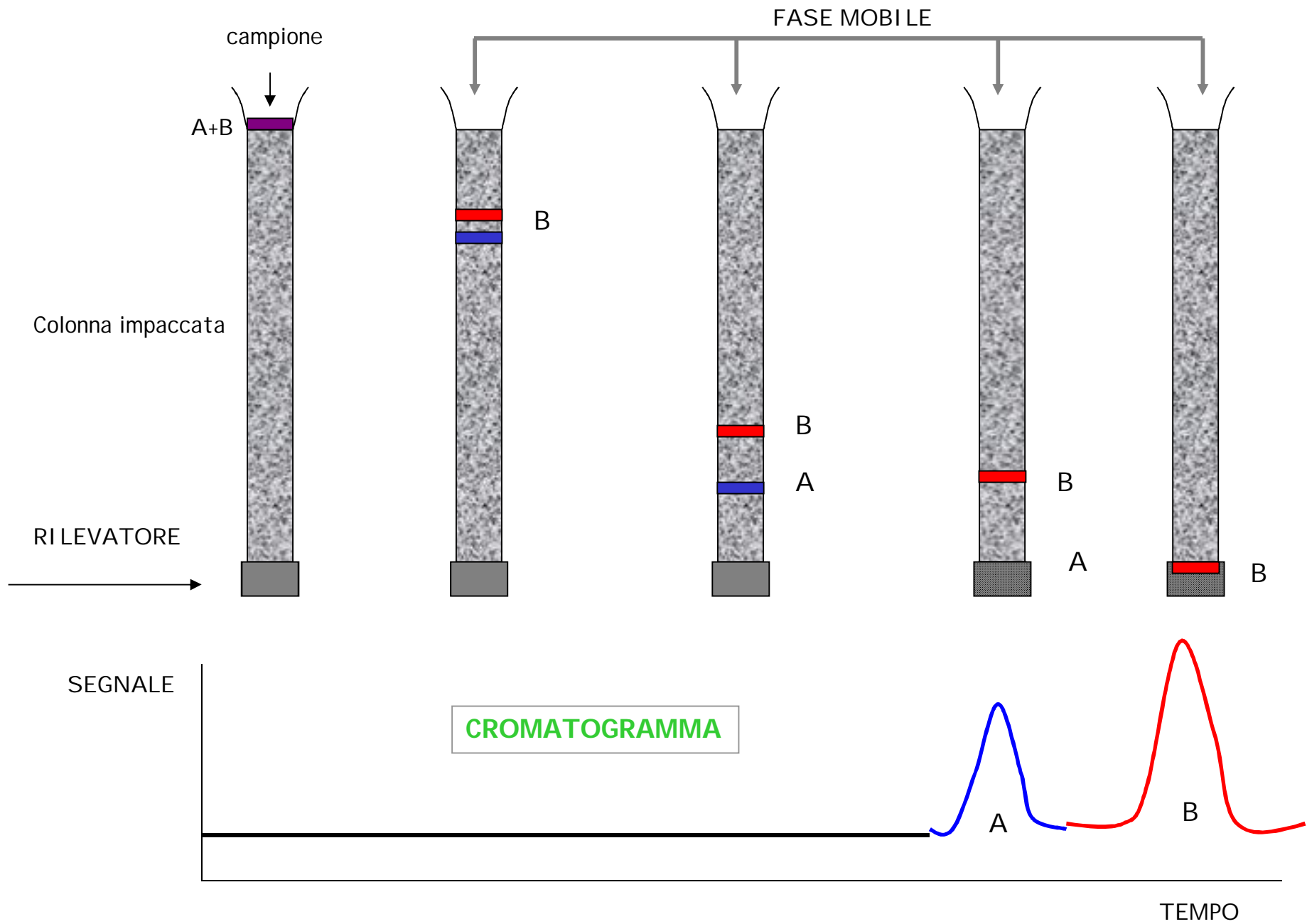
Fase stazionaria: fase fissa in una determinata posizione (o colonna o superficie planare)

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

Classificazione



Cromatografia di eluizione



FASE MOBILE

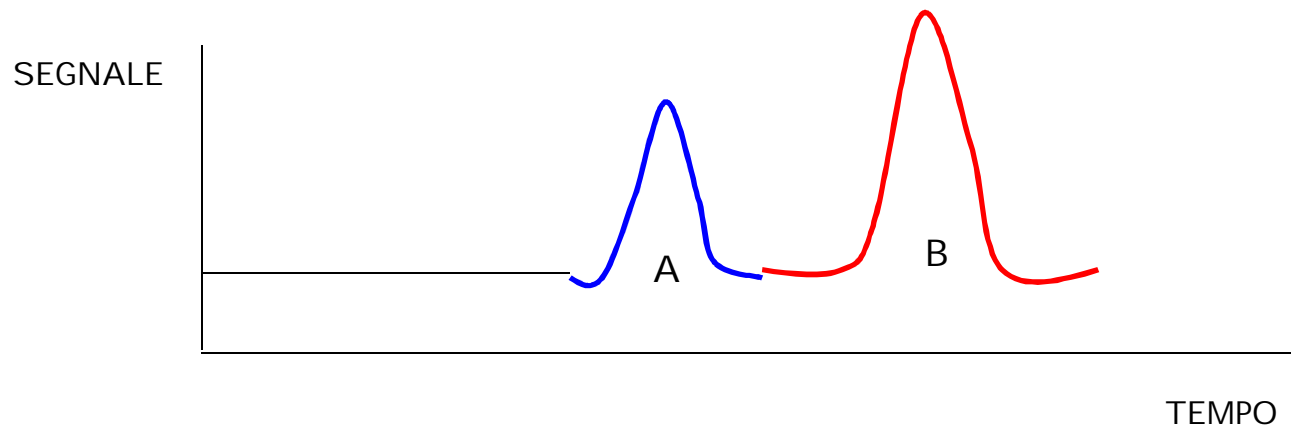


1. Il movimento lungo la colonna avviene solo quando il soluto si trova nella fase mobile
2. La **velocità** dipende quindi dal tempo che il soluto trascorre nella fase mobile

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.

CROMATOGRAMMA



Informazioni QUALITATIVE
Informazioni QUANTITATIVE

POSIZIONE DEI PICCHI

DIMENSIONI (ALTEZZA E AREA) DEI PICCHI



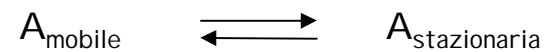
NECESSITA' DI AVERE PICCHI BEN DEFINITI

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



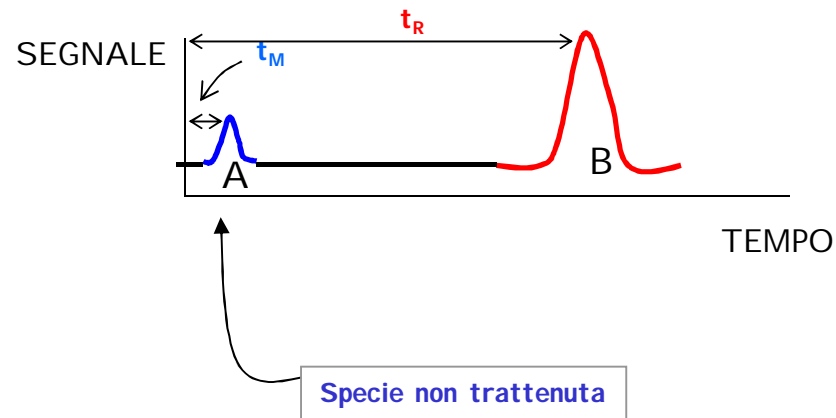
$$K = C_S / C_M$$



$$C_S = K C_M$$

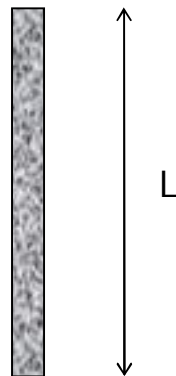
Questa proporzionalità è valida in un ampio intervallo di concentrazione, ciò determina l'indipendenza del tempo di eluizione dalla concentrazione

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*

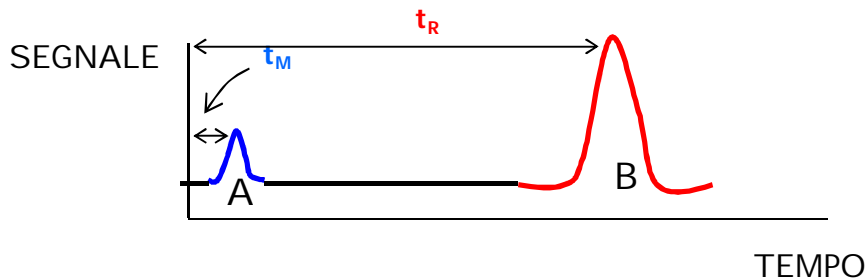
$$k'_A = \frac{K_A V_S}{V_M}$$

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

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

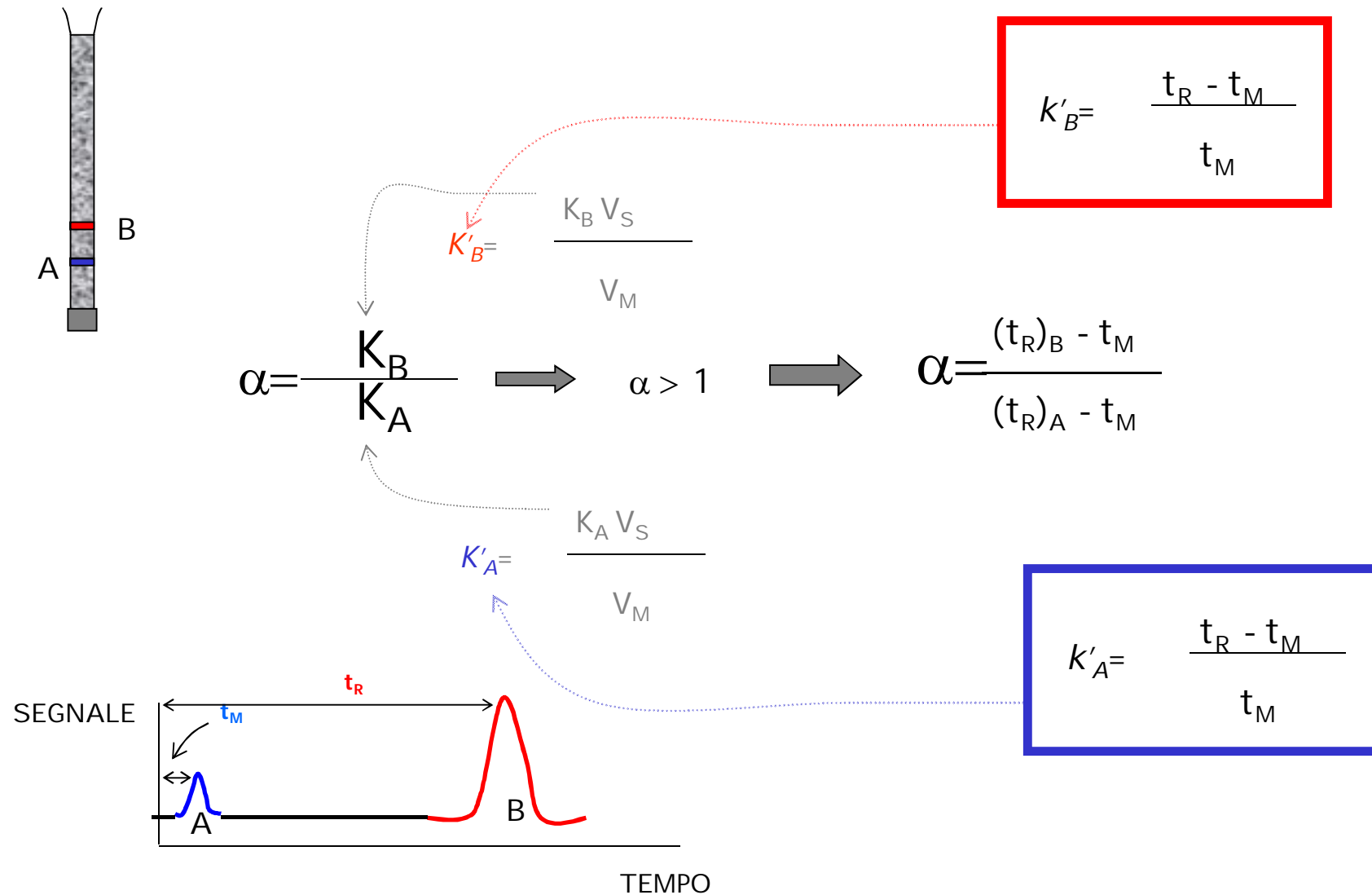
$$k'_A = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

k'_A ideale tra 1 e 5!

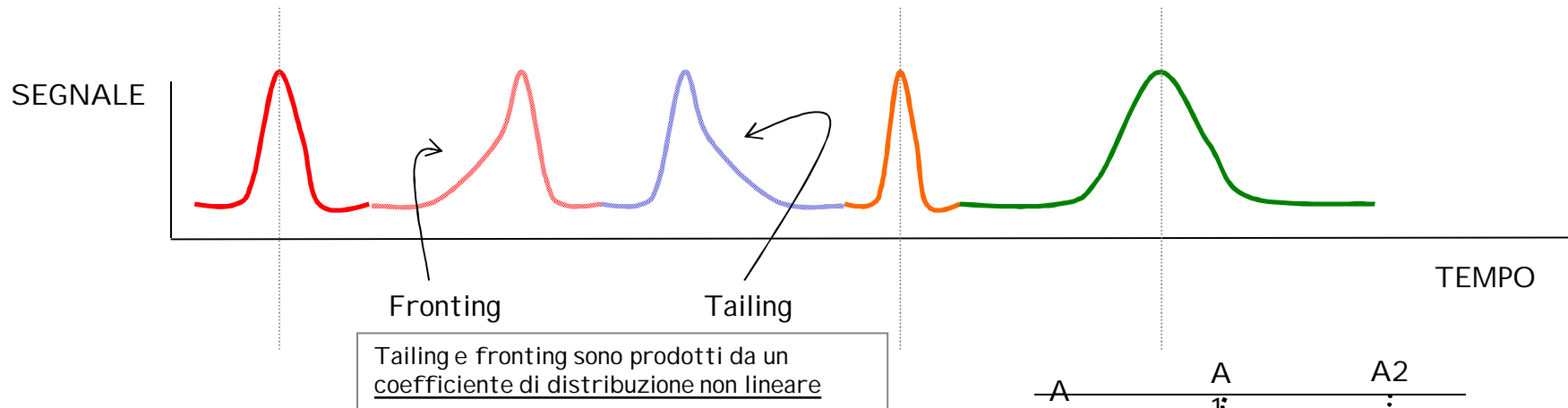


Fattore di selettività, indice della velocità di migrazione relativa di due soluti

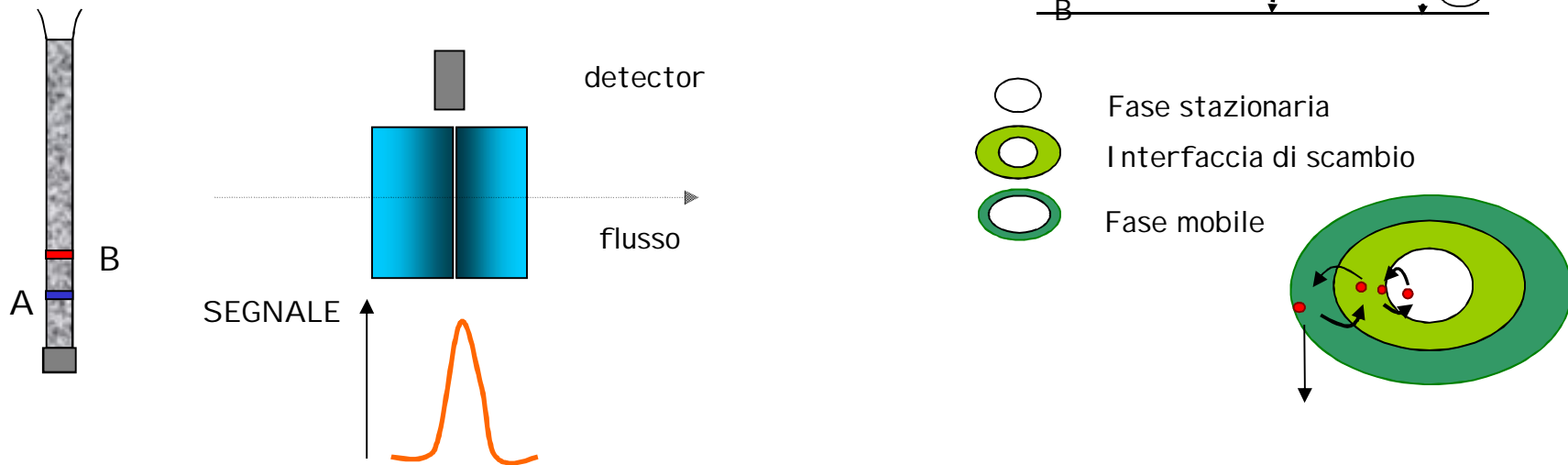
► Parametro che può essere calcolato *sperimentalmente*



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

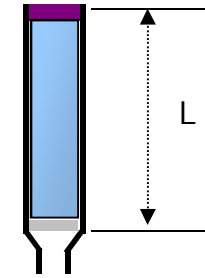
Efficienza di una colonna cromatografica

Altezza di un piatto teorico H

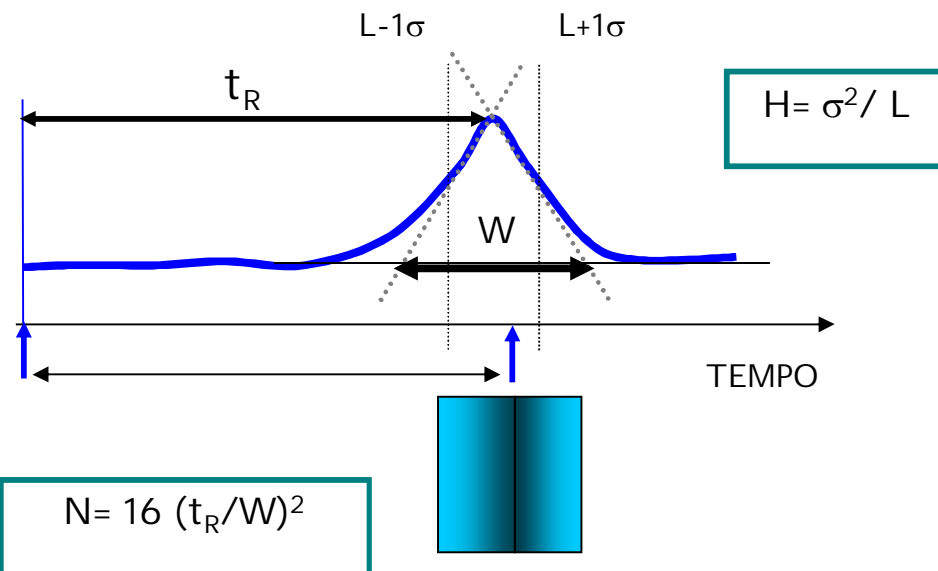
Numero di un piatti teorici N



$$N=L/H$$

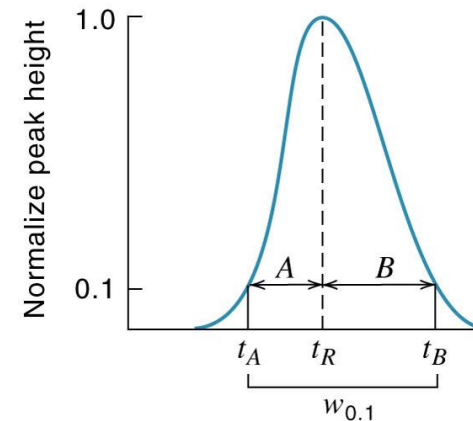


L'efficienza di una colonna è proporzionale ad N, quindi **inversamente** proporzionale **all'altezza** di un piatto.



Intensità di colore = numero di molecole di analita

Picco asimmetrico (tailing)

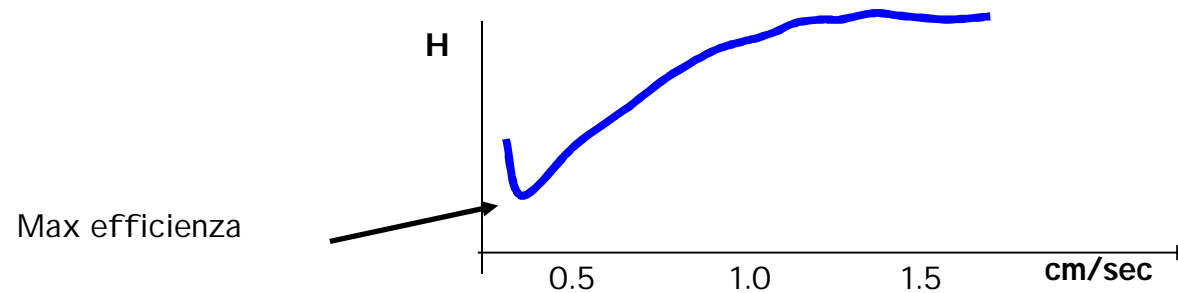


$$N = 41.7(t_R/w_{0.1})^2 / (A/B + 1.25)$$

Variabili che influenzano l'efficienza di una colonna

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

➤ Velocità lineare della fase mobile



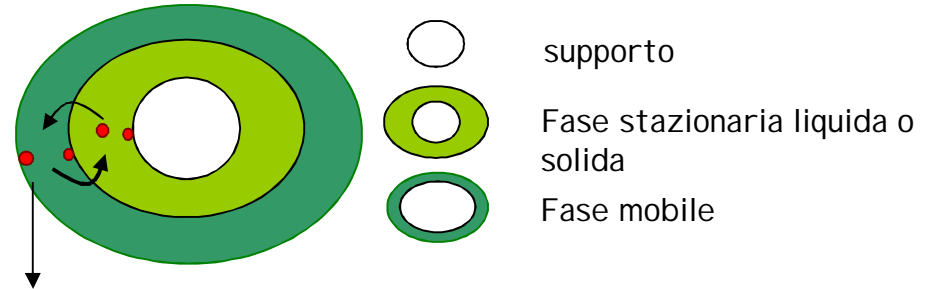
- Cromatografia liquida colonne 25-50 cm
- Gas-cromatografia fino a decine di m

Teoria dell'allargamento della banda; equazione di Van Deemter

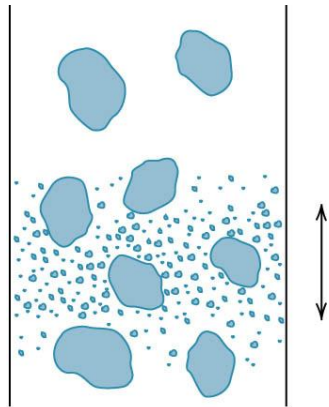
$$H = B/u + C_S u + C_M u$$

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



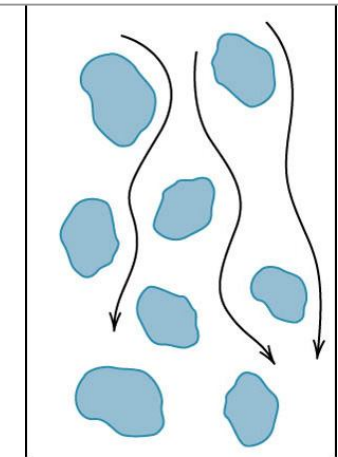
Coefficiente di **trasferimento di massa** nella fase mobile:
inv. prop. a D_M , funzione di (diametro particelle)² (diametro colonna)² e u



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)

Diffusione turbolenta



Eddy diffusion

PARAMETRI DI UNA COLONAN CROMATOGRAFICA

- Fattore di Capacità

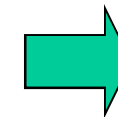
$$k'_A = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

- Selettività

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

- Efficienza

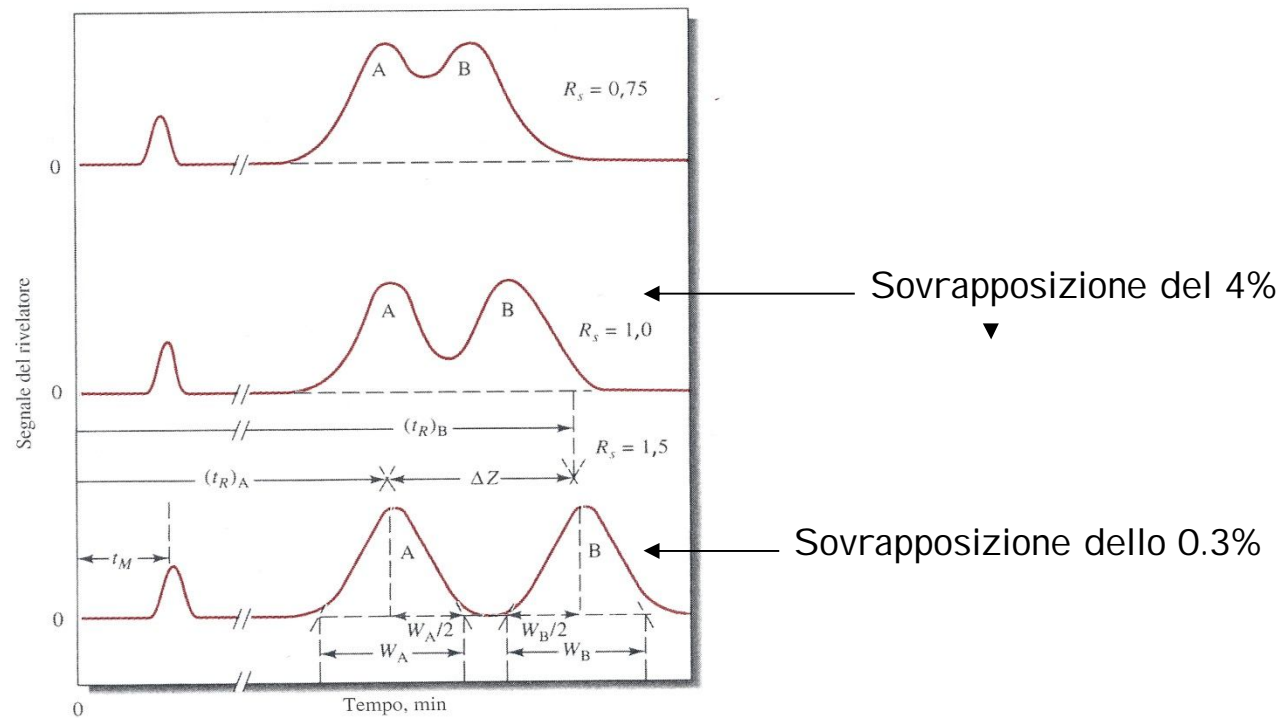
$$H = \sigma^2 / L$$



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

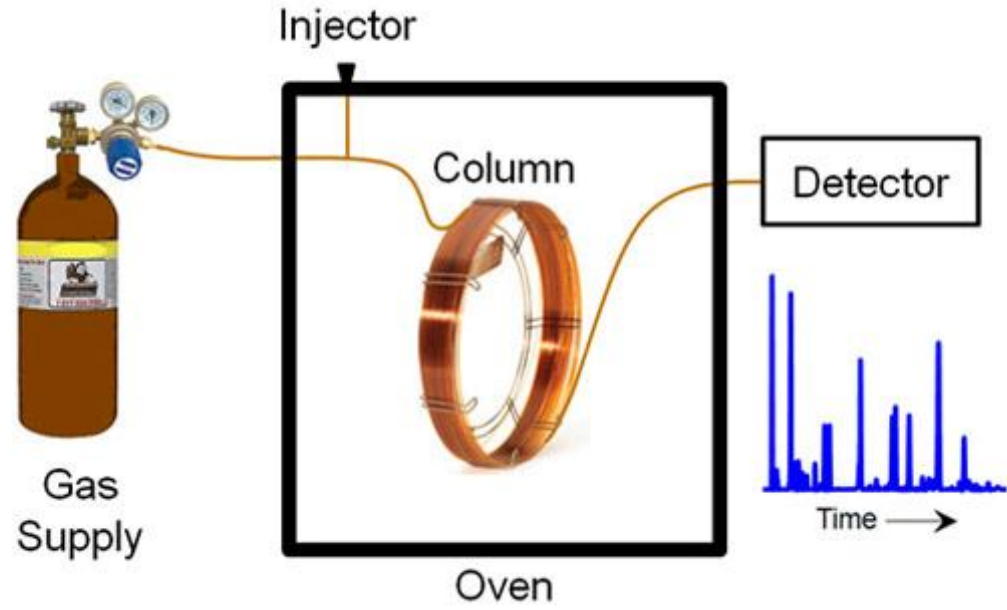
Risoluzione di una colonna

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



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
	Gassoso, a fase legata	Specie organiche legate a superficie solida	Ripartizione tra gas e superficie legata
	Gas-solido	solido	Adsorbimento

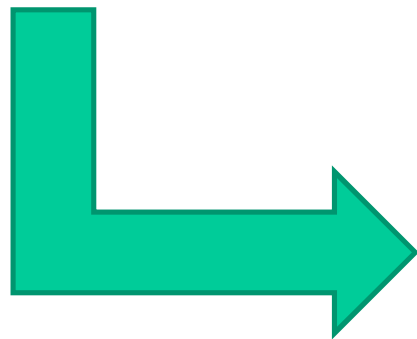
GC



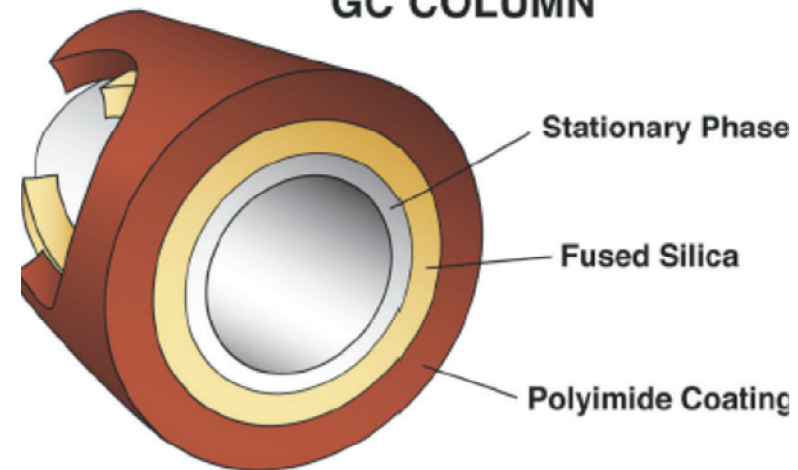
HPLC



COLONNE CAPILLARI PER GC



GC COLUMN



COLONNE IMPACCATE PER HPLC

Standart column hardware

