

CROMATOGRAFIA

Il termine **CROMATOGRAFIA** indica una serie di metodi analitici in grado di:

- ✧ SEPARARE,
- ✧ RICONOSCERE QUALITATIVAMENTE,
- ✧ QUANTIFICARE SINGOLARMENTE

una miscela, anche molto complessa, nei suoi componenti in base alle loro proprietà chimiche e fisiche.



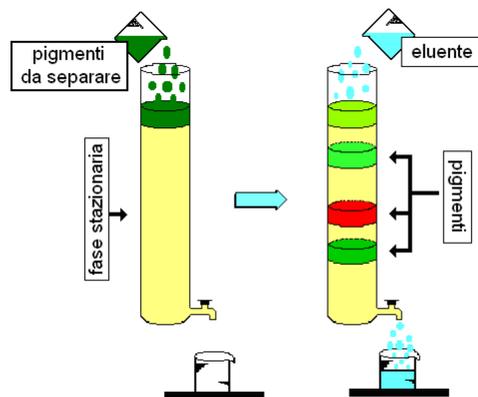
Questi metodi si basano sulla **DISTRIBUZIONE DIFFERENZIALE** dei vari componenti tra due fasi: la **FASE FISSA** (o **FASE STAZIONARIA**) e la **FASE MOBILE** (o **ELUENTE**, che fluisce in continuo attraverso la fase fissa)



CROMATOGRAFIA

UN PO' DI STORIA

Il termine **CROMATOGRAFIA** deriva dal greco **CHROMA**: colore e **GRAPHEIN**: scrivere ed è legato al suo inventore, un botanico russo di nome Michail Semenovich Tswett che all'inizio del XX secolo intendeva separare le sostanze coloranti della clorofilla.



Tswett fece un estratto di foglie verdi in etere di petrolio, lo depositò in testa ad una colonna di vetro impaccata con *carbonato di calcio* ed *elui* (cioè versò di continuo) con *solfuro di carbonio*. I pigmenti si separarono in singole bande colorate lungo la colonna.

Egli intuì che la separazione era dovuta alla differente **AFFINITÀ** che i vari pigmenti avevano per la polvere calcarea



CROMATOGRAFIA

UN PO' DI STORIA



Michail Tswett
(1872-1919)

Tswett interagì con la scuola tedesca di chimica organica del grande Willstätter, il cui allievo prediletto, Richard Kuhn, grazie alla cromatografia riuscì a separare e a cristallizzare α - e β -carotene.



Richard Willstätter
(1872-1942)

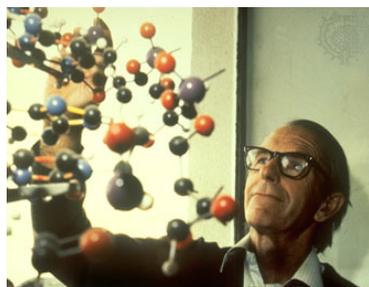


Archer Martin
(1910-2002)

Nel 1933 Martin, mettendo a confronto le caratteristiche della distillazione con quelle della cromatografia, progettò e realizzò una macchina in grado di separare la Vitamina E. Studi successivi e una intensa collaborazione con Synge lo portarono a sviluppare la cromatografia liquido - liquido.



Richard Synge
(1914-1994)



Frederick Sanger
(1918)

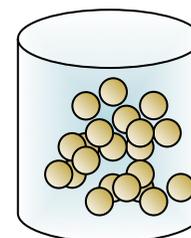
Sfruttando le diverse potenzialità della cromatografia per scambio ionico, della ionoforesi, dell'adsorbimento su carbone e della cromatografia su carta Sanger e i suoi collaboratori 'ricostruirono' le catene A e B dell'insulina (Premio Nobel 1957, Premio Nobel 1980)



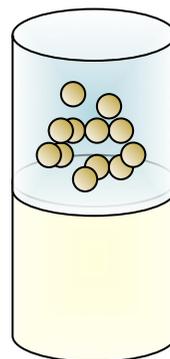
CROMATOGRAFIA

IL MECCANISMO DI BASE

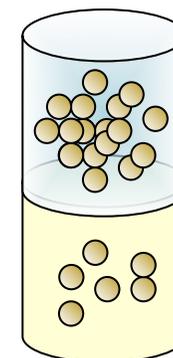
Si supponga di avere una singola sostanza sciolta nella minima quantità di un dato solvente.



Se a questa soluzione viene “*affacciato*” un uguale volume di un altro solvente immiscibile nel primo,...



... la sostanza si distribuirà tra i due solventi arrivando a concentrazioni che dipendono dalle caratteristiche dei solventi e della sostanza



Le concentrazioni di equilibrio rimangono costanti pur essendo le molecole in continuo passaggio da una fase all'altra. Si tratta di un equilibrio dinamico caratterizzato dalla relazione

$$K = \frac{[A]_{\text{Fissa}}}{[A]_{\text{Mobile}}}$$



CROMATOGRAFIA

IL MECCANISMO DI BASE

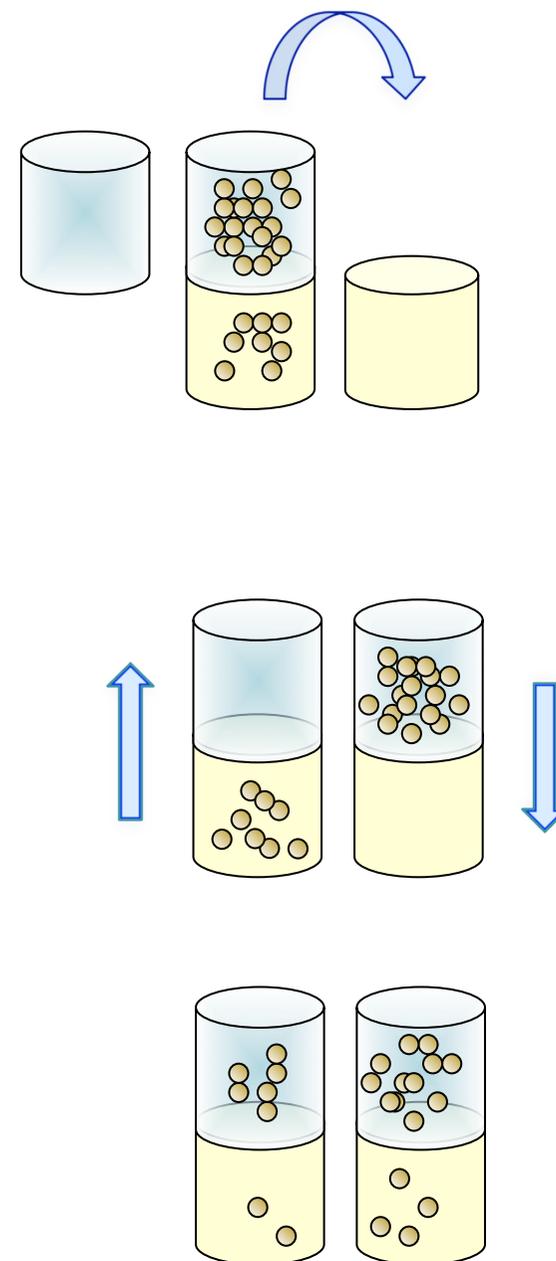
Se ora entrambe le porzioni sono affacciate a nuovi volumi di solvente differente ...



... tenendo cioè fissa la posizione della porzione inferiore (FASE STAZIONARIA) e spostando quella superiore (FASE MOBILE) ...



... in ciascuna coppia ottenuta la sostanza si distribuirà secondo lo stesso rapporto che era stato rispettato nella prima "equilibratura".



CROMATOGRAFIA

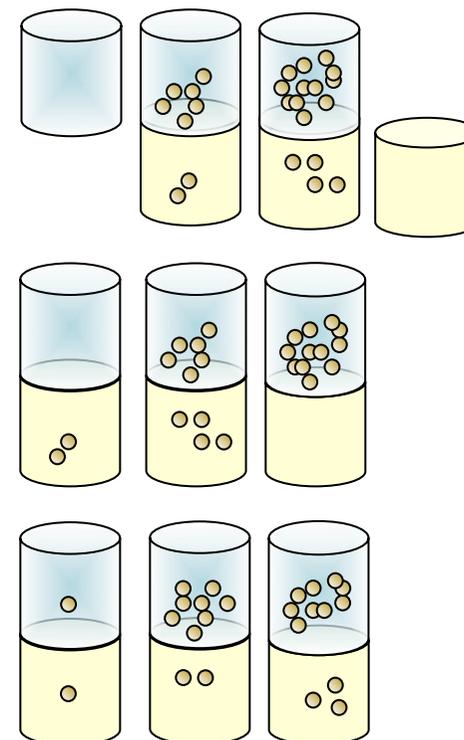
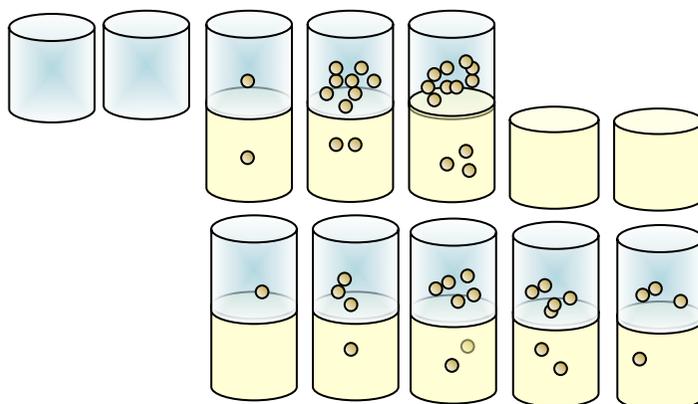
IL MECCANISMO DI BASE

Ripetendo lo stesso processo con volumi puliti degli stessi solventi ...

... mantenendo sempre fissa la fase stazionaria e spostando la fase mobile ...

... in ciascuna coppia ottenuta, la sostanza si distribuirà secondo lo stesso rapporto osservato nella prima "equilibratura".

Iterando più volte la stessa operazione ...



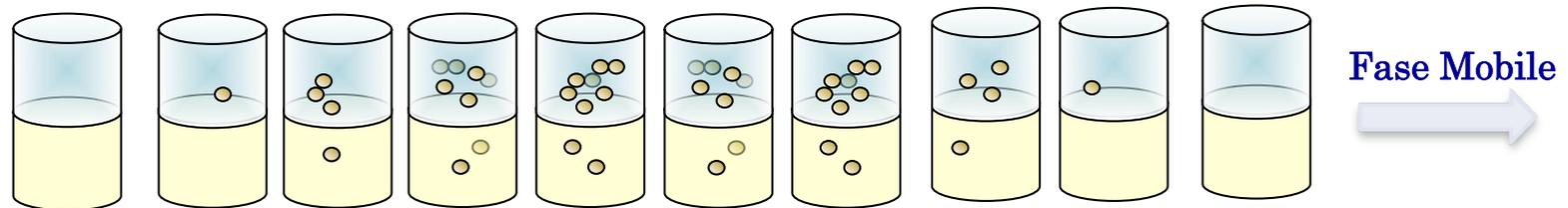
... in tutte le successive coppie (fase fissa/fase mobile) la sostanza si distribuirà secondo il rapporto osservato inizialmente.



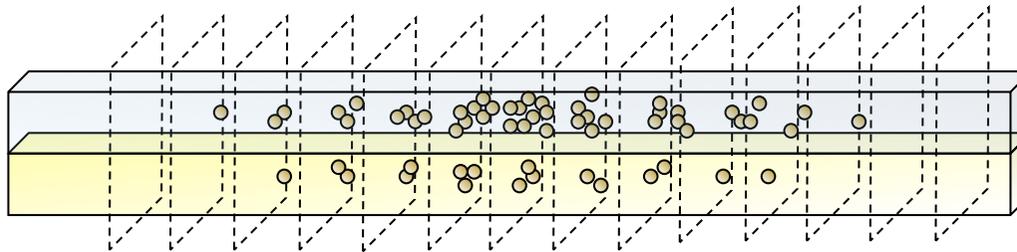
CROMATOGRAFIA

IL MECCANISMO DI BASE

Dopo molte iterazioni , le distribuzioni che si instaurano mostrano che la sostanza:

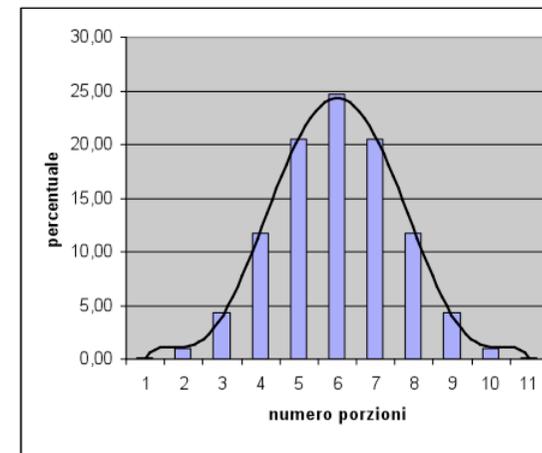


- si sposta seguendo la direzione della fase mobile,
- si accumula preferenzialmente nelle porzioni centrali.



Un flusso di fase mobile che scorra sulla fase stazionaria può essere considerata la versione continua del processo

Al diminuire delle dimensioni delle porzioni di soluzioni studiate, cresce il loro numero. Contemporaneamente, il grafico che rappresenta l'andamento della concentrazione sarà caratterizzato da barre sempre più vicine. All'aumentare del numero delle porzioni, congiungendo gli estremi delle barre si otterrà una curva dall'andamento gaussiano



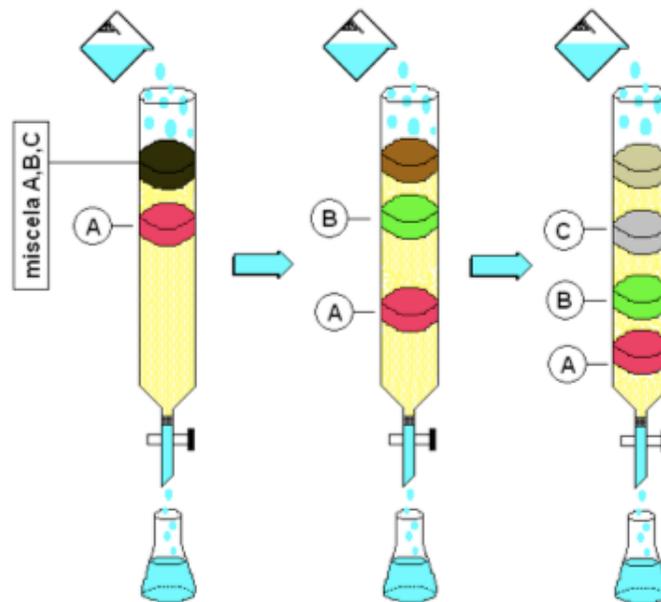
CROMATOGRAFIA

PRINCIPI FONDAMENTALI

I metodi cromatografici sfruttano la diversa **AFFINITÀ** delle molecole e degli ioni nei confronti di due fasi diverse:

- ✓ una liquida o gassosa in movimento **ELUENTE o FASE MOBILE (FM)**
- ✓ una solida o liquida fissa insolubile nella precedente **FASE STAZIONARIA (FS)**

Si consideri una miscela costituita da tre componenti A, B, C da separare. La Fase Stazionaria (FS) costituita da piccole particelle solide ($d < 150 \mu\text{m}$) viene impaccata all'interno di un tubo lungo e sottile che costituisce la colonna cromatografica



La miscela viene posta in cima alla FS, si fa fluire l'eluente (FM) a velocità costante, producendo uno spostamento delle varie sostanze della miscela attraverso la FS.

Le singole sostanze si distribuiscono tra la FS e la FM, in modo differenziato in funzione della diversa affinità con le due fasi.



CROMATOGRAFIA

PRINCIPI FONDAMENTALI

La distribuzione per ciascun componente X lungo la colonna può essere espressa dall'equilibrio:

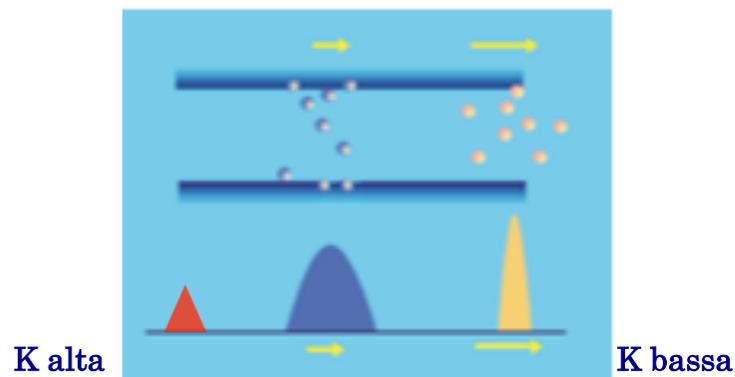


Ad una determinata temperatura ($T = \text{costante}$), per ciascuno dei componenti della miscela (A, B, C) si potrà scrivere un **COEFFICIENTE DI RIPARTIZIONE (DISTRIBUZIONE)**, che dipenderà anche dalla coppia di fasi usate:

$$K = \frac{[X]_S}{[X]_M}$$

- Un **ALTO VALORE** di K indica che il singolo componente è più affine alla fase stazionaria e si muoverà più **LENTAMENTE** lungo la colonna:
- **BASSI VALORI** di K indicano una maggiore affinità per la fase mobile e si avrà uno spostamento, lungo la colonna, più **RAPIDO**.

Questo diverso comportamento consente una separazione tra i vari componenti A, B, C man mano che la fase mobile eluisce.



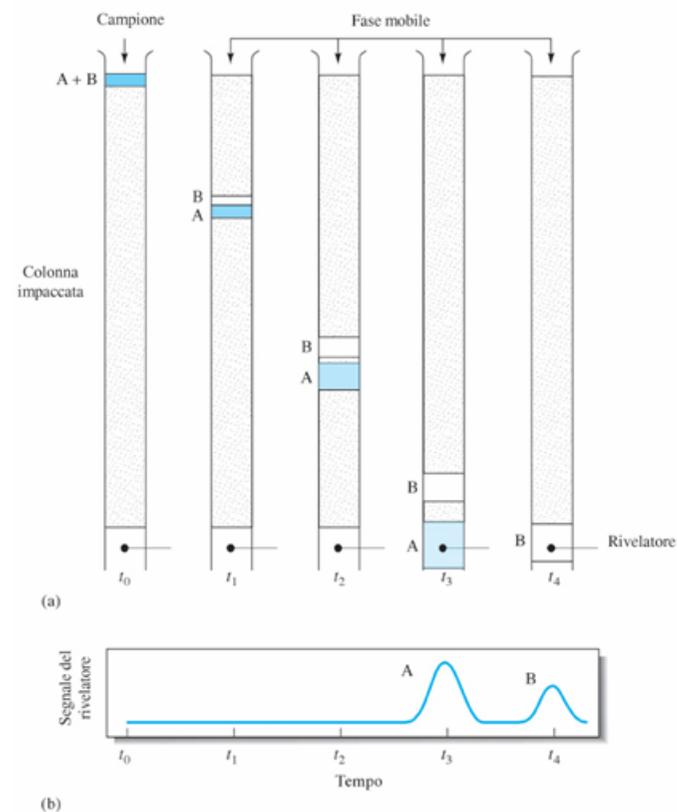
CROMATOGRAFIA

PRINCIPI FONDAMENTALI

Ponendo all'uscita della colonna un dispositivo (RIVELATORE) che misuri la concentrazione del soluto nell'eluato (cioè la fase mobile che esce dalla colonna) e riportando il segnale in funzione del tempo si può ottenere un **CROMATOGRAMMA** in grado di descrivere il processo di separazione:

La posizione dei picchi sull'asse dei tempi, o tempo di ritenzione, serve per identificare i componenti del campione.

L'area sottesa dai picchi è proporzionale alla quantità di ogni singolo componente e può essere utilizzata a scopo quantitativo.



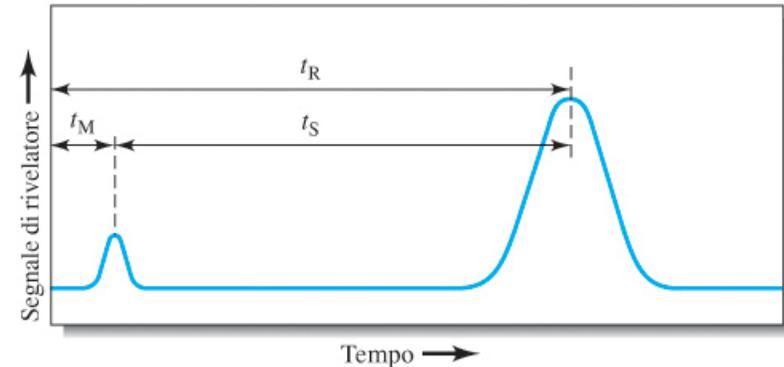
CROMATOGRAFIA

PRINCIPI FONDAMENTALI

A) TEMPO DI RITENZIONE (t_R) – TEMPO MORTO (t_M)

Il Tempo di Ritenzione è il tempo che impiega un componente della miscela ad uscire dalla colonna o, tecnicamente, ad essere rivelato come picco dal detector.

Un tipico *cromatogramma* per una miscela a due componenti ha due situazioni diverse:



- il picco a sinistra rappresenta un soluto che non ha alcuna interazione con la FS ed esce al tempo morto, t_M (tempo impiegato da una sostanza, che non interagisce con la FS, per scorrere attraverso la colonna)
- il picco a destra rappresenta un soluto che interagisce con la FS ed esce al tempo $t_R > t_M$.

B) FATTORE DI CAPACITÀ

Il FATTORE DI CAPACITÀ K' è un parametro sperimentale usato spesso per descrivere le velocità di migrazione dei soluti nelle colonne ed è definito come :

differenza tra il tempo di ritenzione ed il tempo morto in unità di tempo morto

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



CROMATOGRAFIA

PRINCIPI FONDAMENTALI

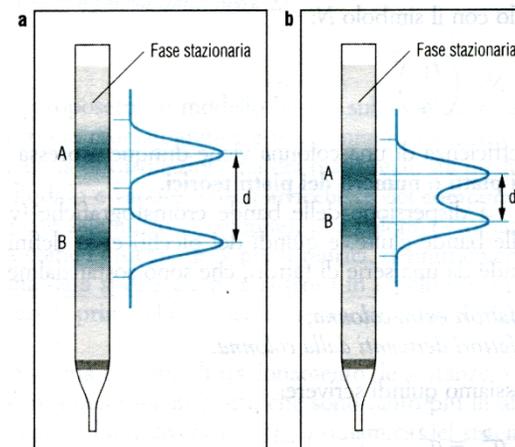
C) SELETTIVITÀ

La **SELETTIVITÀ** indica la capacità di un sistema cromatografico di eluire specie chimiche diverse con velocità tali che escano separate dalla colonna.

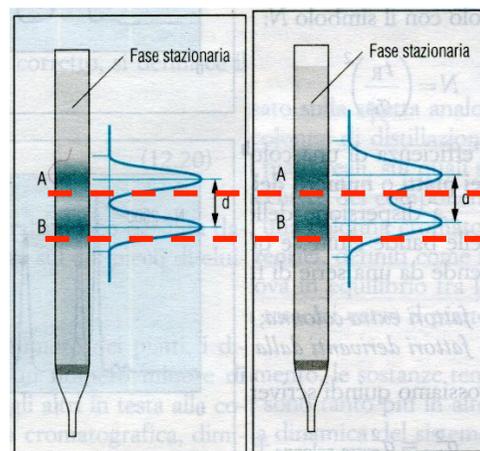
La selettività verso due sostanze in un sistema cromatografico viene espressa dal **FATTORE DI SEPARAZIONE**

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

La selettività dipende dal meccanismo della separazione cromatografica, ma non dalle caratteristiche costruttive e α deve essere $>$ di 1



D) EFFICIENZA



L' **EFFICIENZA** è la capacità di un sistema di formare picchi molto stretti (capacità eluire tutte le molecole di una data specie chimica con la stessa velocità)

Il parametro più semplice con cui esprimere l'efficienza è la **LARGHEZZA ALLA BASE DEL PICCO** (W_b), diversa per ogni specie chimica in un dato sistema cromatografico



CROMATOGRAFIA

PRINCIPI FONDAMENTALI

F) RISOLUZIONE CROMATOGRAFICA

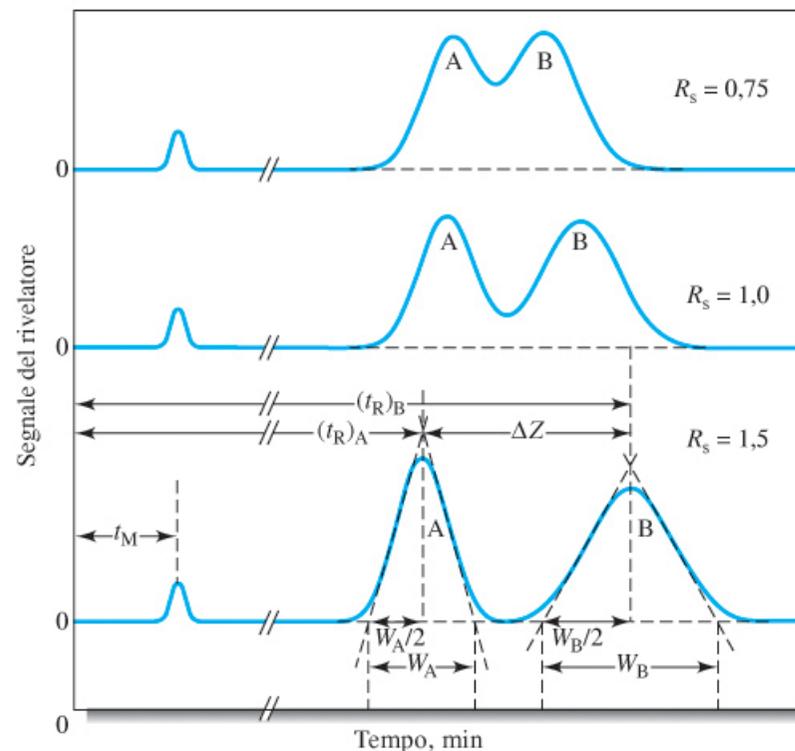
La possibilità di separare due o più sostanze è descritta dalla **RISOLUZIONE**, che misura la capacità di un sistema cromatografico di separare due analiti con caratteristiche simili:

$$R = \frac{2 \times \Delta Z}{(W_A + W_B)}$$

ΔZ = Distanza tra i picchi

W_A = Larghezza alla Base del Picco A

W_B = Larghezza alla Base del Picco B



Se la risoluzione non è sufficiente ($R < 1$), i due picchi non possono essere quantificati in maniera corretta.

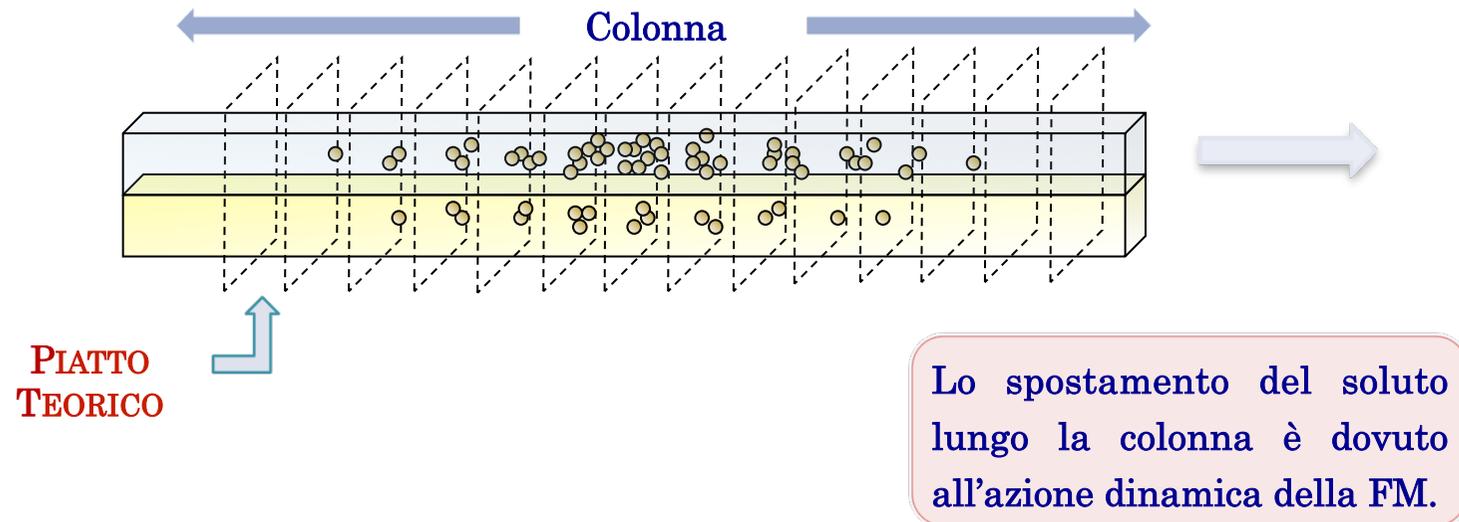


CROMATOGRAFIA

PRINCIPI FONDAMENTALI

G) NUMERO DI PIATTI TEORICI (N)

L'Efficienza di una colonna viene espresso anche con N , detto **NUMERO DEI PIATTI TEORICI**. Il sistema cromatografico è immaginato composto da una serie di strati sottili chiamati **PIATTI TEORICI**; in ognuno di questi microelementi della colonna si realizza l'equilibrio di distribuzione del soluto tra la FS e la FM.



I termini **NUMERO DI PIATTI TEORICI (N)** ed **ALTEZZA DEL PIATTO (HEPT, HEIGHT EQUIVALENT TO A THEORETICAL PLATE)** sono comunemente utilizzati in cromatografia per quantificare le prestazioni dei sistemi cromatografici. In particolare:



CROMATOGRAFIA

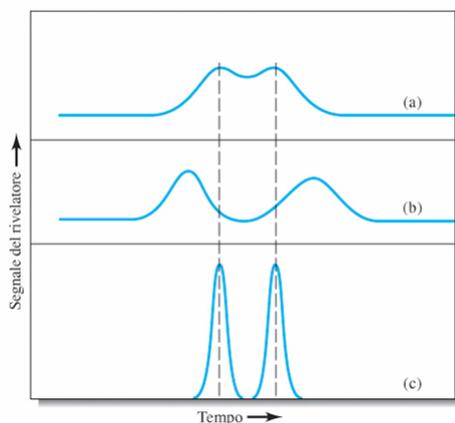
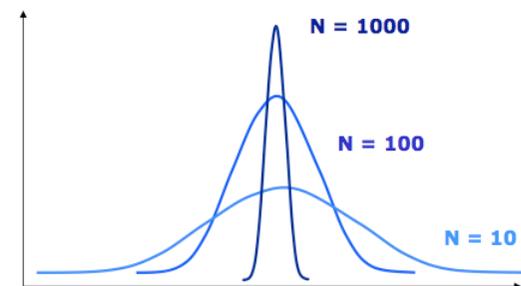
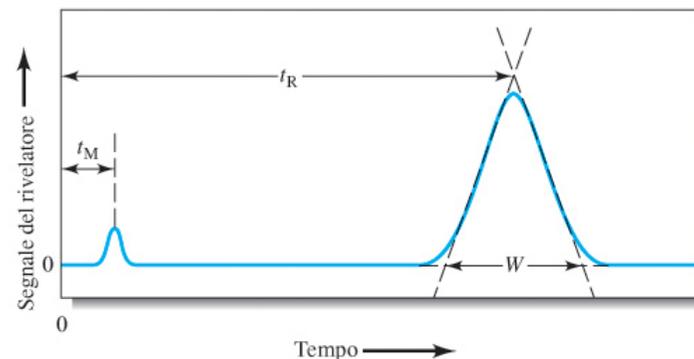
PRINCIPI FONDAMENTALI

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W} \right)^2$$

$$HEPT = \frac{\text{lunghezza della colonna}}{N}$$

NB

- ◆ N non è un parametro caratteristico per una data colonna, ma dipende anche dalla sostanza eluita;
- ◆ I piatti non esistono realmente all'interno di una colonna, ma sono solo un modello per facilitare la comprensione del processo che avviene;
- ◆ L'EFFICIENZA di una colonna aumenta con il numero dei piatti: tanto maggiore è N, tanto più compatta è la banda in uscita



- ◆ L'efficienza di una colonna aumenta al diminuire del valore di HEPT e fornisce quindi picchi più stretti.
 - a) Separazione con scarsa risoluzione e basso N;
 - b) Migliora la risoluzione, ma è sempre basso N;
 - c) Ottima risoluzione e buono N.



CROMATOGRAFIA

INTERAZIONI SOLUTI-FASI

La separazione avviene a seguito di forze di interazione tra i vari analiti e:

1. La fase stazionaria: forze di resistenza alla migrazione;
2. La fase mobile verso la quale si esplicano forze motrici dinamiche di trascinamento nella direzione del suo scorrimento.

Le interazioni che si verificano tra le sostanze da separare e le due fasi (FS e FM) sono deboli: se così non fosse non ci sarebbe trattenimento sulla fase stazionaria oppure, al contrario, eluizione. A scopo separativo sono sfruttate le seguenti interazioni:

- ✓ Legami idrogeno,
- ✓ Interazioni dipolo - dipolo,
- ✓ Interazioni dipolo - dipolo indotto,
- ✓ Forze di Van der Waals,
- ✓ Formazione di composti di interazione,
- ✓ Attrazione columbiana,
- ✓ Interazioni steriche

In tutte queste interazioni svolge un ruolo decisivo la polarità delle due fasi. Spesso possono essere presenti più tipi di interazione nello stesso processo.

