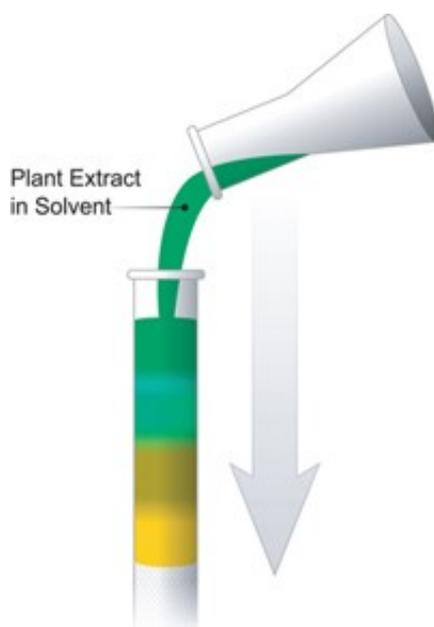


CROMATOGRAFIA

Introduzione e accenni Storici

La **cromatografia** è una tecnica di separazione, che permette di dividere i vari componenti di una miscela omogenea. Si tratta di un'**analisi di tipo quantitativo** caratterizzata dalla possibilità di operare con piccolissime quantità di campione. ~~L'oggetto di studio posto sotto indagine analitica ne risulta, al termine dell'esperienza, irrimediabilmente compromesso, pertanto si ha la totale perdita del campione in esame.~~

I primi tentativi di tecniche cromatografiche sono attribuibili al botanico russo Michail Tsweett e risalgono agli inizi del '900; il suo esperimento "fondamentale" prevedeva l'utilizzo di una colonna riempita di carbonato di calcio, alla quale poneva dei pigmenti vegetali. Infine, veniva aggiunta una miscela di alcol etilico ed etere di petrolio, la quale, attraversando la colonna, trascina con sé le varie componenti della sostanza madre. Il semplice esperimento dimostrò come il pigmento vegetale di colore verde, sia composto in realtà da diverse componenti, che raggiungono il fondo della colonna con modalità e tempistiche differenti.



Esperimento fondamentale di Tsweett

Principi generali della cromatografia

La **cromatografia** è una tecnica di separazione di sostanze presenti in miscela e si avvale di 2 fasi: la **fase stazionaria (F.S.)** - generalmente un solido - e di una **fase mobile (F.M.)** detta anche **eluente** - liquida o gassosa in base alla tecnica utilizzata.

Nella cromatografia su colonna la F.M. Fluisce verso il basso per gravità (nei dispositivi più semplici) o per l'azione della pressione (nel caso di mezzi più sofisticati come per l'HPLC o nella GC). La cromatografia trova fondamento nella **diversa affinità di un analita per le due fasi, mobile e stazionaria**: maggiore è la propensione di un componente per la F.S. e più tempo questi impiegherà ad attraversare la colonna; diversamente se l'analita ha maggiore affinità verso la F.M., questi ultimerà il percorso della colonna con maggior rapidità.

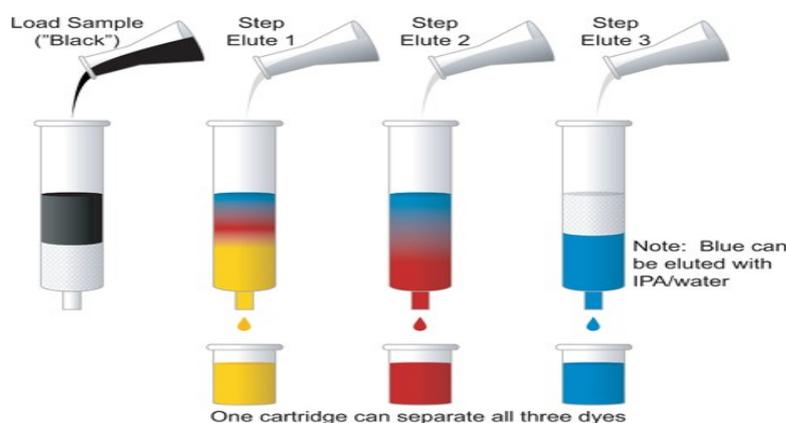
Modalità di attrazione dell'analita per la fase stazionaria.

Esistono 5 metodi con cui la F.S. può trattenere l'analita, e sono:

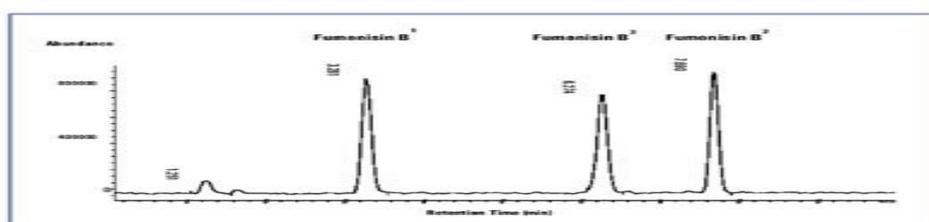
- **adsorbimento** – in questo caso l'analita forma dei legami deboli (forze di Van Der Waals: legame dipolo-dipolo) con la F.S. ;
- **ripartizione** – esiste una particolare propensione dell'analita verso l'eluente o verso il liquido che costituisce la F.S.;
- **esclusione** – sfrutta il principio dell'ingombro sterico dell'analita, in base alle diverse dimensioni delle molecole, alcune saranno trattenute, altre passeranno facilmente attraverso la colonna;
- **scambio ionico** – si formano delle interazioni di tipo elettronico tra l'analita e gli ioni presenti nelle resine di scambio ionico costituenti la F.S..
- **affinità** – un primo stadio prevede l'uso di reazioni biochimiche che "paralizzano" le molecole di analita nella F.S., successivamente l'intervento dell'eluente rompe i legami formatosi tra le molecole e la F.S. ottenendo la separazione.

Cromatogramma

Prendendo come esempio una semplice cromatografia, analizzeremo i parametri fondamentali che ci permettono di leggere ed interpretare un **cromatogramma**, ovvero un grafico che ci mostra le diverse concentrazioni dell'analita nel tempo.



Nella figura sovrastante, osserviamo come da una sostanza iniziale, possiamo ottenere, tramite separazione cromatografica, le diverse componenti di cui è composta la miscela omogenea di partenza. Nella figura in basso invece, possiamo notare il **gas** cromatogramma relativo a tale cromatografia: ad ogni picco sul grafico, corrisponde un determinato analita, che ha sostato con modalità e tempistiche diverse all'interno della colonna.



Esempio di separazione cromatografica: ad ogni picco del cromatogramma corrisponde un determinato analita presente nella miscela

Dinamica elementare della separazione cromatografica

In ogni istante del processo cromatografico si realizza una sorta di competizione fra le due fasi nei confronti della sostanza eluita.

Durante l'eluizione in ogni punto della colonna, la sostanza è coinvolta in un processo dinamico di trasferimento tra le due fasi: dalla fase stazionaria a quella mobile e viceversa.

Ogni componente della miscela tende a distribuirsi fra le due fasi passando attraverso una serie infinita di stati di equilibri che si realizzano in ogni strato di spessore infinitamente piccolo ("infinitesimo") della colonna.

Il tempo di eluizione in un esperimento cromatografico dipende dal tempo che ogni sostanza trascorre nella fase stazionaria, mentre il tempo trascorso nella fase mobile è lo stesso per tutti i componenti della miscela.

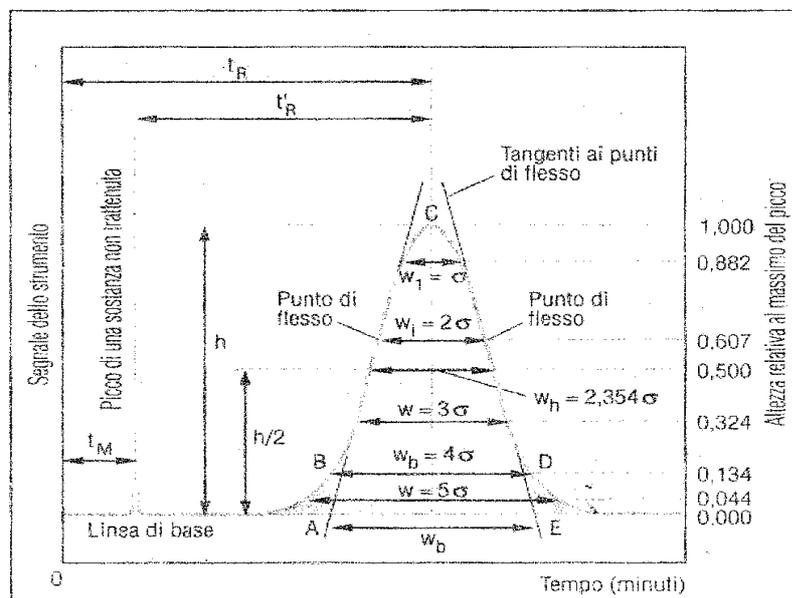
Tecniche cromatografiche

E' possibile classificare le varie tecniche cromatografiche in diversi modi: in base al meccanismo principale di separazione; in base al tipo di fase mobile; secondo la strumentazione.

Fase Mobile	Strumentazione	Principi di separazione	Tecnica
Liquida	Colonna	Ripartizione	LLC cromatografia liquido/liquido
		Adsorbimento	LSC cromatografia liquido/solido
		Scambio ionico	IEC cromatografia a scambio ionico
		Esclusione	GPC cromatografia a permeazione di gel
	Strato sottile	Ripartizione	TLC cromatografia su strato sottile
		Adsorbimento	TLC cromatografia su strato sottile
	Cromatografo liquido	Scambio ionico	TLIEC cromatografia scambio ionico su strato sottile
		Ripartizione	HPLC cromatografia ad alte prestazioni
Gassosa	Gasromatografo	Ripartizione	GLC cromatografia liquido/gas
		Assorbimento	GSC cromatografia liquido/solido

Cromatogramma

Il cromatogramma è il grafico prodotto dell'analisi cromatografica; in condizioni ideali si tratta di una curva gaussiana.



Cromatogramma ideale: Curva Gaussiana

Il cromatogramma fornisce le seguenti informazioni:

- **Altezza del picco (h)** = distanza fra il punto di massimo e la tangente alla fine di base;
- **Larghezza della base del picco (w_b)** = lunghezza del segmento interpolato all'intersezione fra le tangenti ai flessi della gaussiana e la linea di base [$w_b = 4\sigma$];
- **Tempo morto (t_M)** = tempo impiegato dal solo eluente per attraversare la colonna; corrisponde al primo picco presente sul cromatogramma; Tempo morto (t_M) e **Volume morto (v_M)** rappresentano lo stesso valore in funzione del tempo o del volume;
- **Tempo di ritenzione (t_R)** = tempo impiegato da un componente della miscela per scorrere attraverso la colonna;
- **Tempo di ritenzione corretto (t'_R)** = tempo impiegato da un componente della miscela privato del tempo impiegato dall'eluente [$t'_R = t_R - t_M$].

~~Grandezze, equazioni e parametri fondamentali~~

~~Esistono diversi parametri fondamentali che si occupano di definire la qualità del cromatogramma. Tali parametri sono:~~

- ~~**Costante di distribuzione (K_c)** = $\left[K_c = \frac{C_S}{C_M} \right]$ — grandezza termodinamica che dipende dalla natura della F.S. e della F.M.; fornisce indicazioni sulla affinità di una miscela rispetto alla F.S.: maggiore è il valore di K_c , maggiore sarà l'affinità alla F.S.;~~
- ~~**fattore di ritenzione (k)** = $\left[k = \frac{t'_R}{t_M} \right]$ — parametro termodinamico e cinetico;~~

Cromatografia

Metodo di separazione di miscele di analiti, basato sulla loro distribuzione tra due fasi:

- **Fase mobile** si muove con continuità a contatto con la fase stazionaria (**gas, liquido**)
- **Fase stazionaria** fase fissa (**solido, liquido**)

CROMATOGRAFIA LIQUIDA LC

Liquido – Liquido (**LLC**)

Liquido – Solido (**LSC**)

Scambio ionico (**IEC**)

Gel filtrazione
(Size exclusion, **SEC**
o Gel Permeation **GPC**)

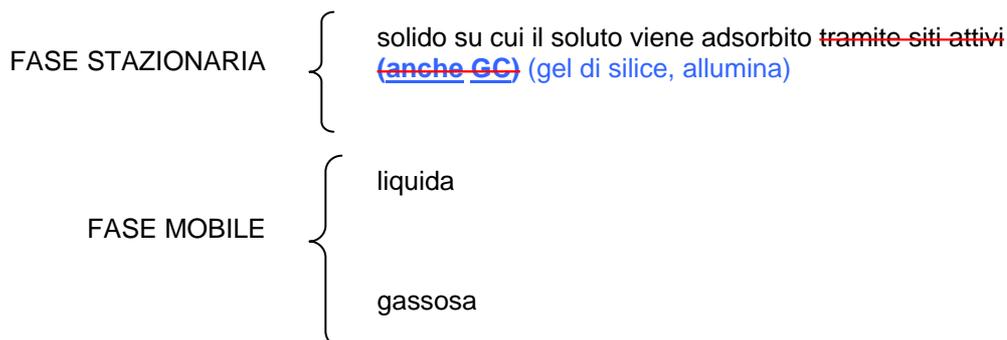
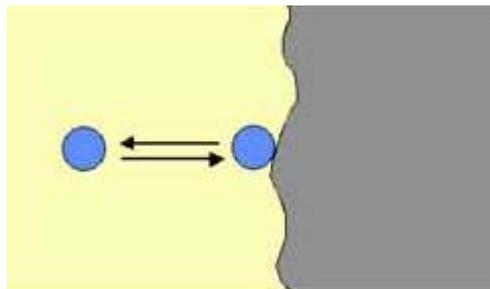
GASCROMATOGRAFIA GC

Gas – Liquido (**GLC**)

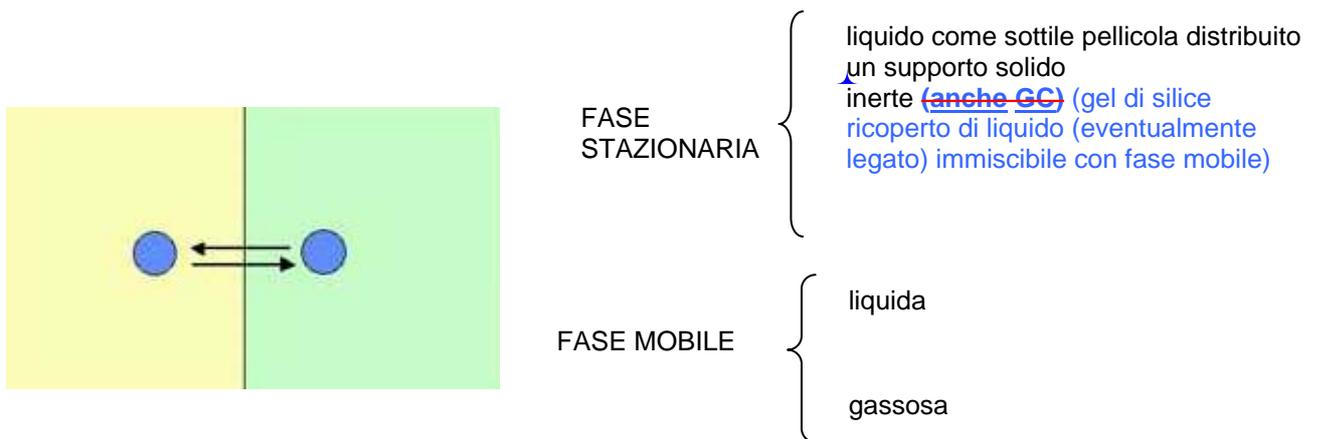
Gas – Solido (**GSC**)

Varie classi di cromatografia:

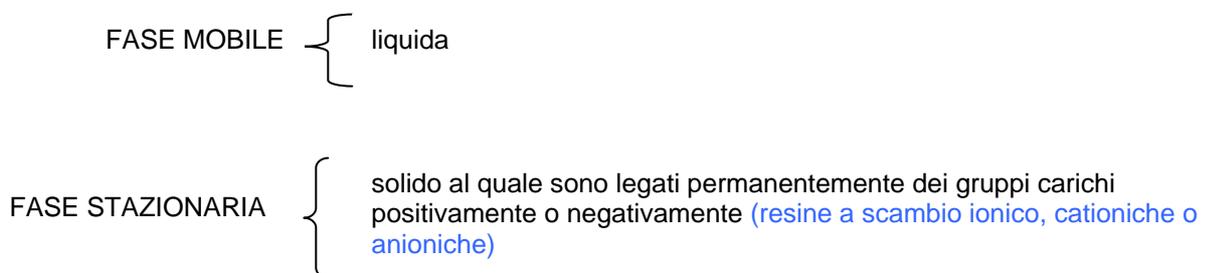
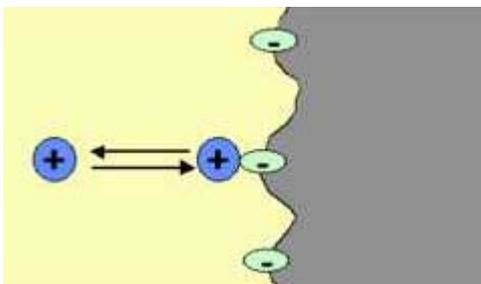
- 1) **CROMATOGRAFIA DI ADSORBIMENTO** (sviluppata per prima nel 1903 da M. Tswett)



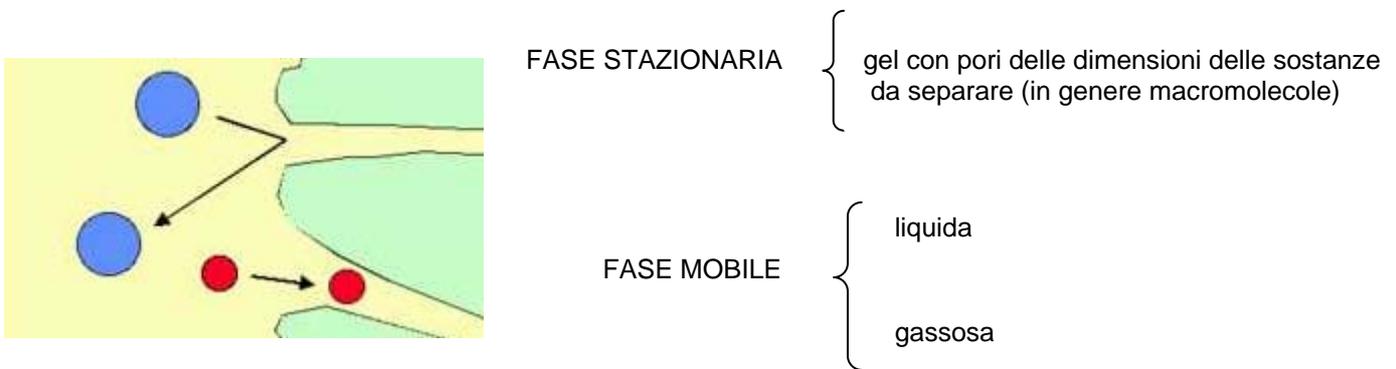
2) CROMATOGRAFIA DI RIPARTIZIONE



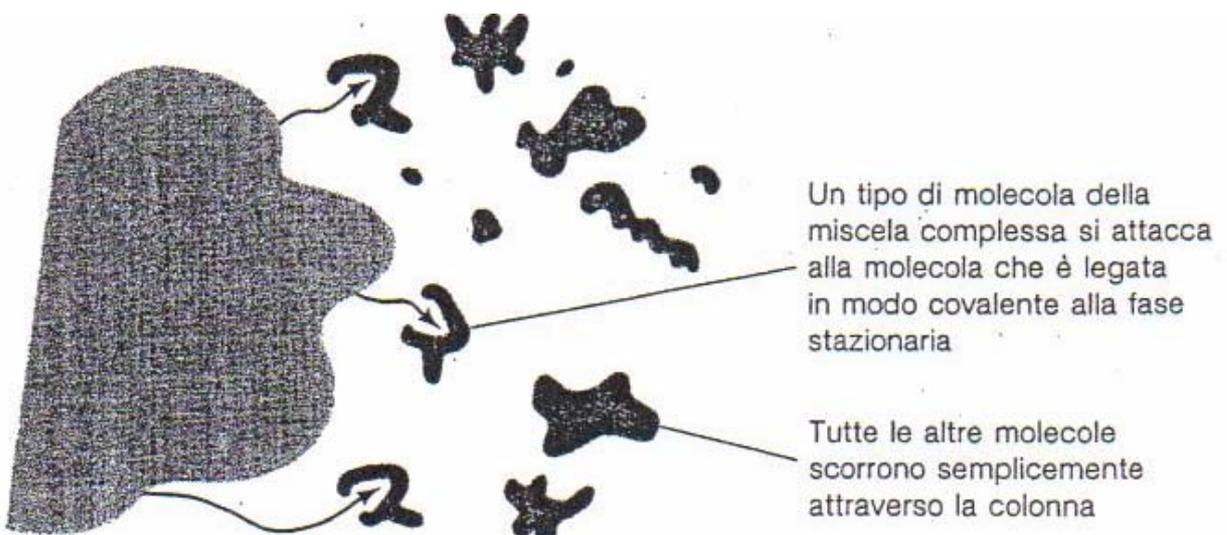
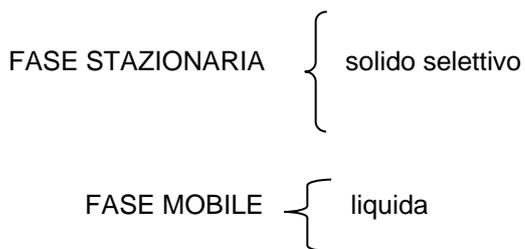
3) CROMATOGRAFIA A SCAMBIO IONICO (~~solo LC~~)



4) CROMATOGRAFIA A ESCLUSIONE MOLECOLARE (o FILTRAZIONE SU GEL)



5) CROMATOGRAFIA PER AFFINITA'



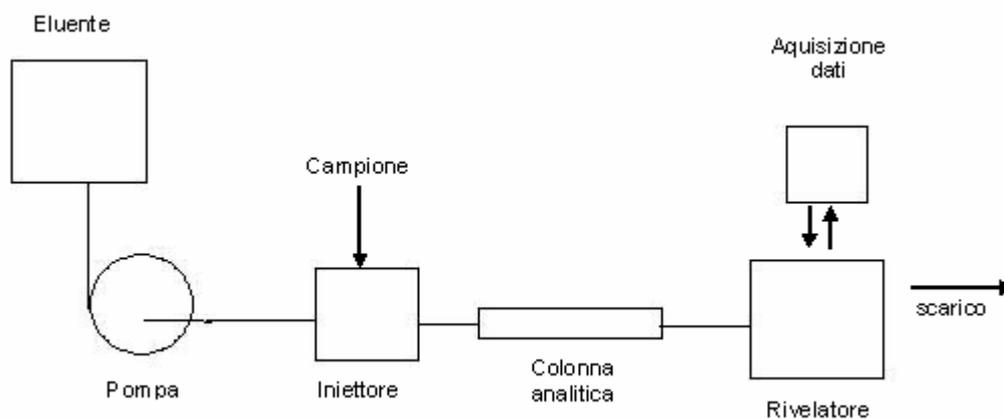


Cromatografia su colonna: fase stazionaria contenuta in colonne di vario diametro

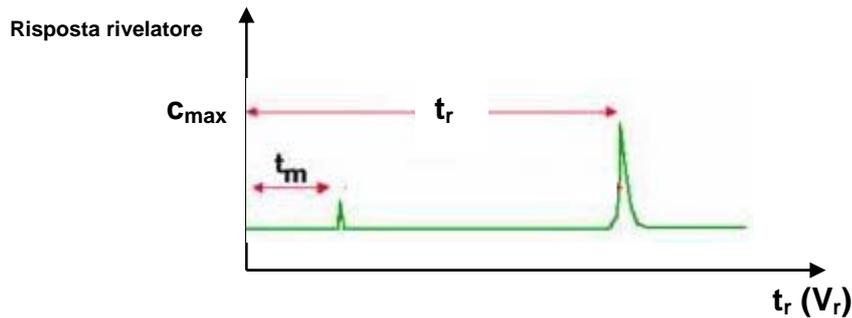


Cromatografia su strato sottile (TLC)

Schema a blocchi di un generico cromatografo liquido:



Il campione è iniettato mediante l'**iniettore** in testa alla colonna, mentre l'eluente passa continuamente attraverso la stessa. Gli analiti presenti nel campione viaggiano nella colonna a diverse velocità e di conseguenza passano attraverso il **rivelatore** con tempi differenti.



✦ Il **cromatogramma** è un grafico in cui si riporta in ordinata la variazione del segnale del rivelatore al passaggio degli analiti in funzione del tempo.

✦ Si ottengono dei profili a forma di picco o banda, che indicano che i tempi di permanenza delle molecole di una stessa sostanza in colonna non sono uguali.

✦ I picchi sono abbastanza simili a curve gaussiane.

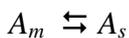
✦ **L'area del picco cromatografico è proporzionale alla quantità di sostanza iniettata, e alla sua concentrazione se vengono iniettati volumi costanti.**

✦ Se le condizioni sono identiche anche l'altezza del picco è proporzionale alla quantità di analita.

✦ La posizione del picco sull'asse delle ascisse è data dal tempo di ritenzione (o dal volume di ritenzione), che corrisponde al massimo del picco, cioè al momento in cui la più alta frazione di molecole di quella sostanza passa attraverso al rivelatore.

Distribuzione di un soluto tra due fasi

Consideriamo un sistema ad un soluto (A) e due fasi immiscibili. Il componente A viene a distribuirsi fra fase stazionaria (s) e fase mobile (m) secondo il seguente equilibrio:



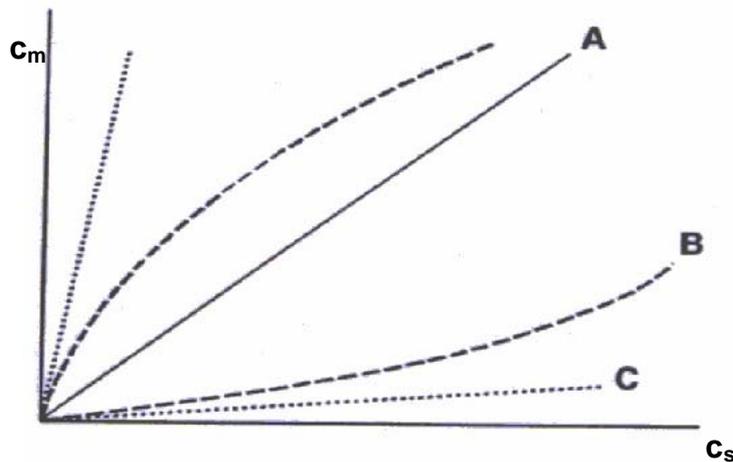
cui corrisponde un **coefficiente di distribuzione** $K_D = \frac{c_s}{c_m} = \frac{[A]_s}{[A]_m}$

- un elevato valore di K_D indica che il componente A preferisce la fase stazionaria e si muove lentamente attraverso la colonna
- bassi valori di K_D indicano che il componente A ha poca affinità con la fase stazionaria e quindi si muove rapidamente

A causa delle velocità di migrazione diverse i componenti vengono a separarsi tra loro; per effetto del continuo trasferimento le molecole avanzano finché sono nella fase mobile,

sono ferme finchè sono nella fase fissa, la velocità di migrazione è determinata quindi dal coefficiente di distribuzione.

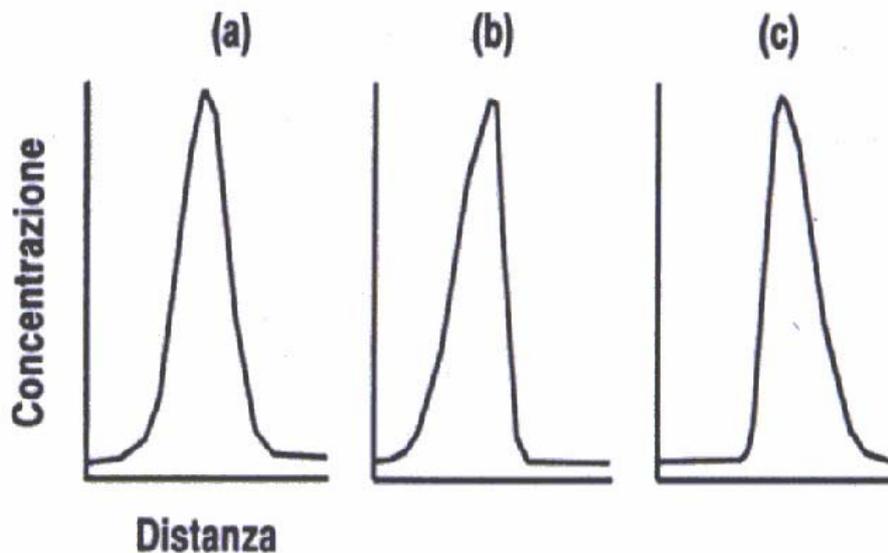
Isoterma di adsorbimento



Isoterma di adsorbimento = figura che correla le concentrazioni nelle due fasi a temperatura costante

- ~~Nel caso ideale (curva A) K_D è indipendente dalla concentrazione di soluto e i profili di concentrazione, definiti **picchi**, sono simmetrici ed hanno l'andamento di una funzione gaussiana o normale.~~
- ~~In un sistema non ideale, K_D dipende dalla concentrazione, quindi le molecole si distribuiscono tra la fase mobile e quella stazionaria in funzione della concentrazione. Questo provoca una dissimmetria nella banda cromatografia.~~

~~Le deviazioni dall'idealità porteranno a diverse tipologie di picchi:~~



- ~~un'isoterma del tipo B darà un effetto di scodamento (tailing)~~
- ~~un'isoterma del tipo C originerà un andamento di salita lenta del picco (fronting)~~