

CROMATOGRAFIA

Insieme di tecniche di separazione di una miscela nei suoi componenti basate sulla **distribuzione differenziale** dei vari componenti fra due fasi:

- **Fase fissa (o fase stazionaria)**
- **Fase mobile (o eluente)**: fluisce in continuo attraverso la fase fissa

Fase fissa (solido o liquido): - non deve reagire con le sostanze da separare
- deve essere insolubile nella fase mobile

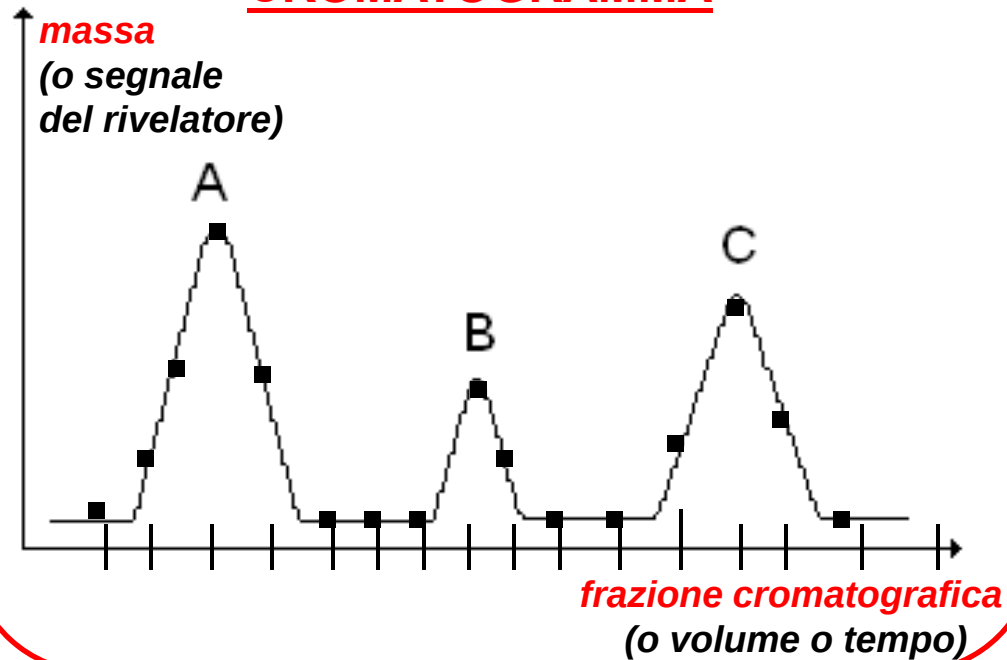
Fase mobile: - non deve reagire con la fase fissa e le sostanze da separare

(liquido) → { **cromatografia liquida**
HPLC (high-performance liquid chromatography)

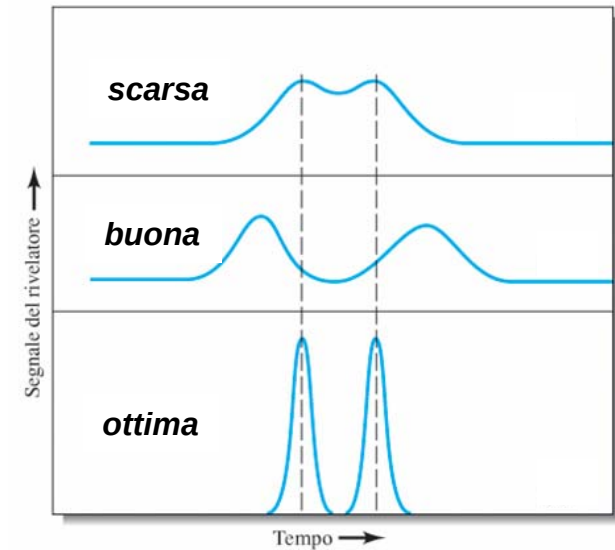
(gas) → **gas-cromatografia**

(fluido supercritico) → **SFC** (supercritical fluid chromatography)

CROMATOGRAMMA



L'efficienza di una colonna cromatografica è inversamente proporzionale all'ampiezza dei picchi del cromatogramma



L'efficienza di una colonna cromatografica viene anche espressa con

N = numero dei piatti teorici

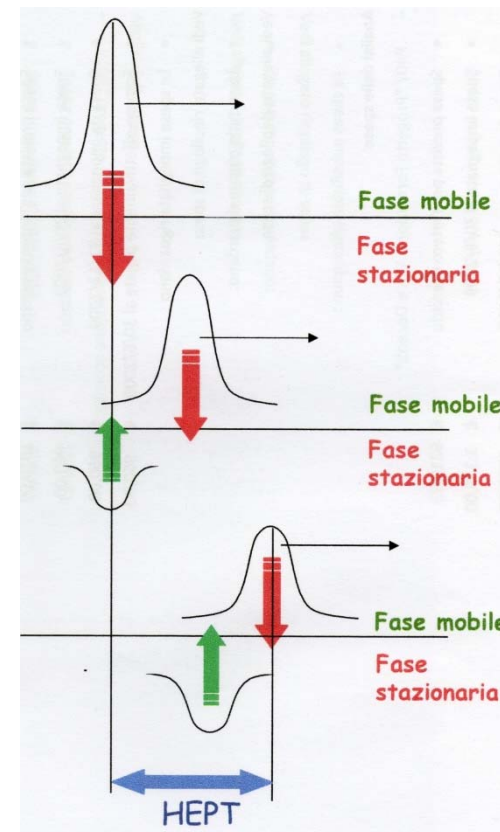
PIATTI TEORICI IN DISTILLAZIONE

Un **piatto teorico** è la più piccola zona all'interno della **colonna di frazionamento** in cui si instaura un equilibrio tra il vapore che sale dal piatto inferiore e il liquido presente sul piatto stesso

ΔT_{EB}	Numero piatti teorici necessari per la separazione
108	1
72	2
54	3
43	4
36	5
20	10
10	20

PIATTI TEORICI IN CROMATOGRAFIA

Un **piatto teorico** è la più piccola zona all'interno della **colonna cromatografica** in cui si instaura un equilibrio differenziale per un dato analita nei confronti di fase mobile e fase stazionaria



L'efficienza di una colonna è inversamente proporzionale all'altezza equivalente di un piatto teorico (**HEPT**)

$$\text{HEPT [cm]} = \frac{\text{lunghezza colonna [cm]}}{\text{numero piatti teorici}}$$

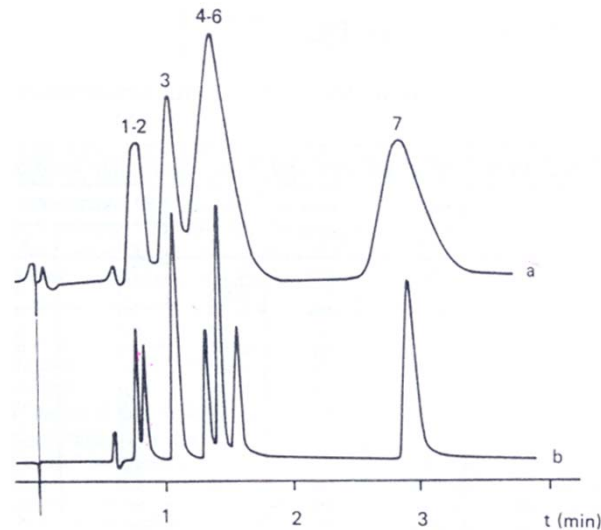
HPLC

HPLC = High Performance (o Pressure) Liquid Chromatography

Perché High Performance?

Il processo di adsorbimento avviene sulla superficie della fase stazionaria per cui la sua efficacia è direttamente proporzionale all'estensione superficiale della fase stazionaria a parità di volume

massa SiO ₂	dimensioni particelle	superficie totale SiO ₂
1 g	60-200 µm	~ 20 m ²
1 g	5 µm	400 m ²

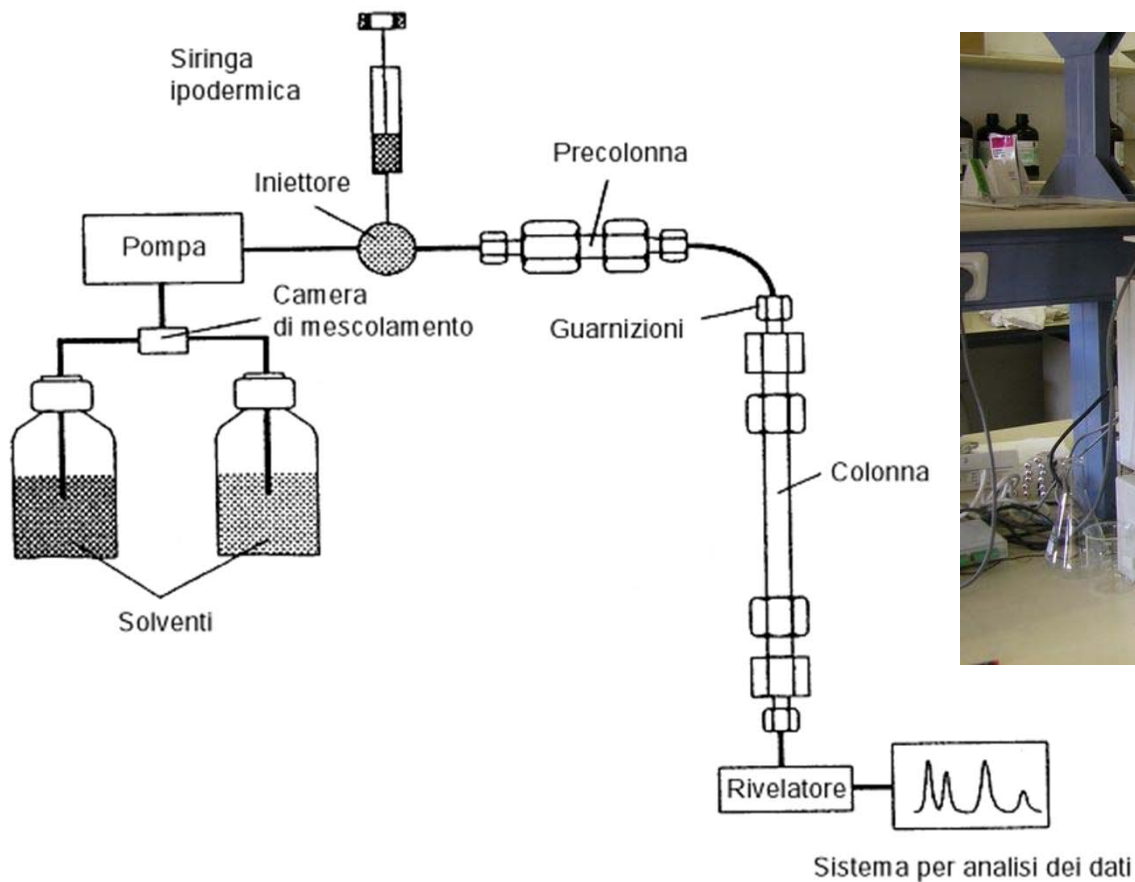


In HPLC si usano microcolonne impaccate di pochi cm di lunghezza costituite da fase stazionaria ad elevatissimo mesh (particelle di 1-5 µm di diametro) → HEPT molto basso (N molto alto)

Perché High Pressure?

Elevatissimo mesh fase stazionaria → pressioni molto alte per forzare il passaggio della fase mobile attraverso la colonna.

Strumentazione HPLC



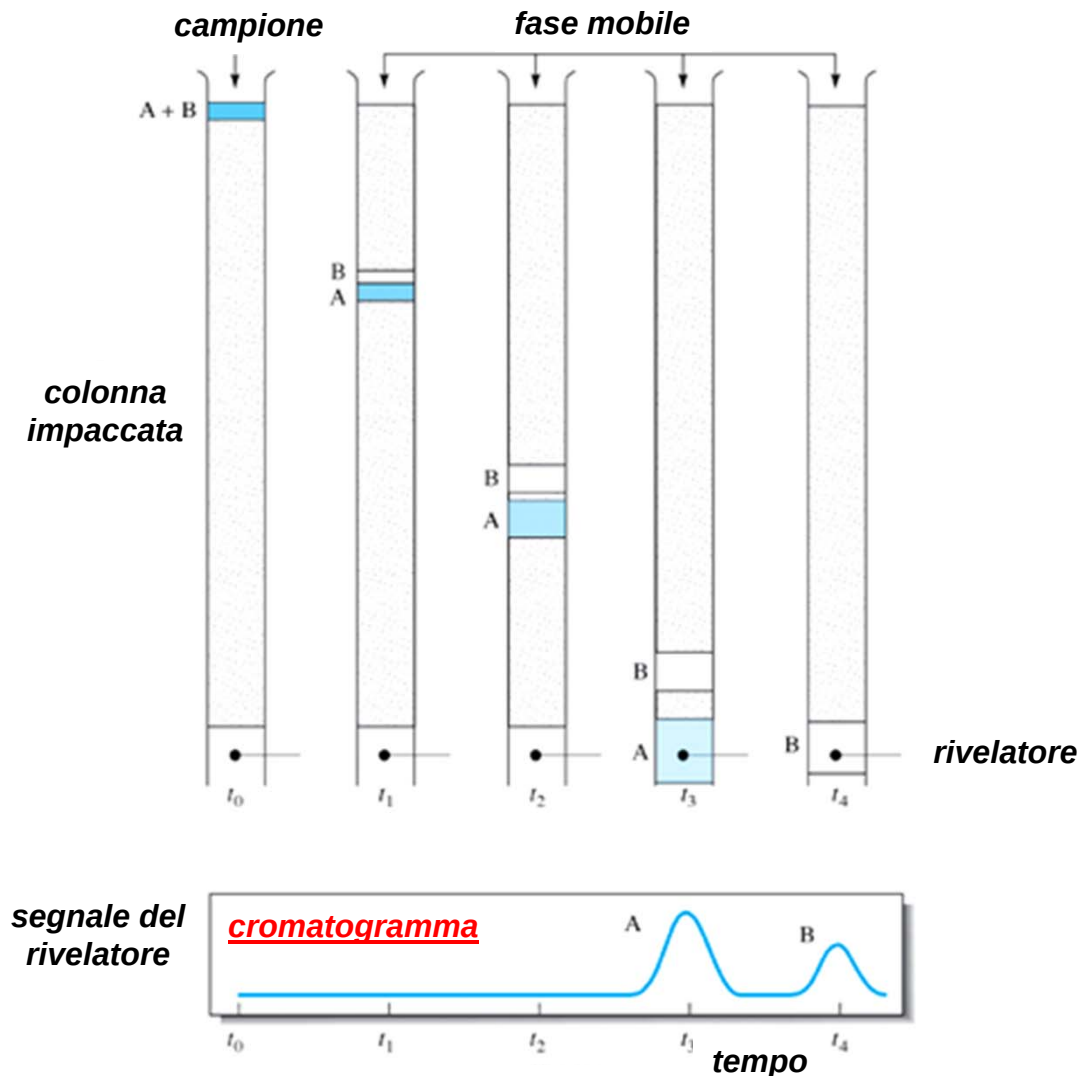
- **solventi**: uno o più solventi, utilizzabili da soli o in miscela, e con eluizione isocratica o in gradiente
- **pompa**: pressioni fino a 400 atm, flusso stabile tra 0.1 e 10 mL/min
- **iniettore**: sistema costituito da una valvola a più vie e da un circuito a volume fisso, o *loop*, nel quale si mette il campione
- **colonna cromatografica**: in acciaio (lunghezza 10-25 cm, diametro 4,6-10 mm) con eventuale *precolonna*, riutilizzabile
- **rivelatore**: per monitorare l'eluato
- **PC**: per gestire il sistema e i dati

Visualizzazione della separazione in HPLC

All'uscita della colonna cromatografica è posto un **rivelatore** che misura la concentrazione del soluto nell'eluato ed è collegato ad un computer in grado di elaborare il risultato durante l'eluizione riportando il segnale in funzione del tempo (**cromatogramma**).

L'eluente non deve dare alcun segnale o un segnale costante

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



TEMPO DI RITENZIONE (t_R): tempo di permanenza di una sostanza in colonna

$$t_R = V_R / F_C$$

(con F_C = flusso costante)

- dipende dalla diversa affinità della sostanza con la fase mobile e la fase stazionaria

- è un parametro che serve ad identificare gli analiti del campione

Rivelatori HPLC

- spettrofotometrico UV-visibile: molto comune, misura la luce assorbita ad una λ fissa (assorbanza) dall'eluato

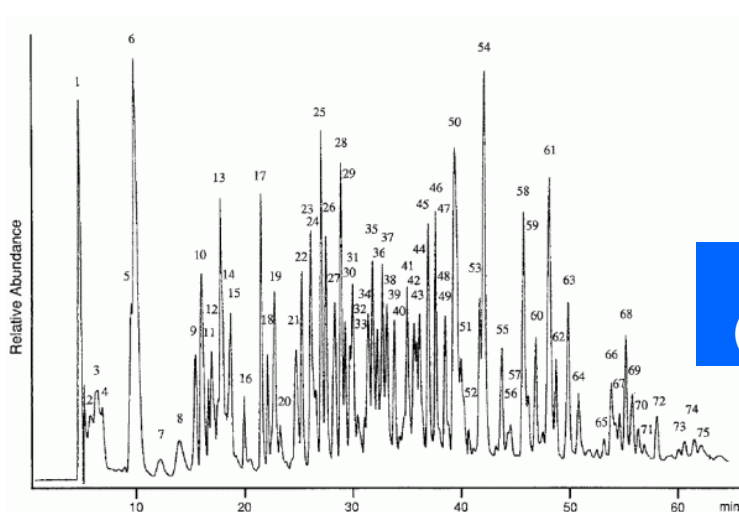
selettivo per molecole con gruppi funzionali che assorbono luce UV-visibile
(doppi legami C=C, C=O, C=N, tripli legami, sistemi coniugati, composti aromatici, nitroderivati etc.)

- spettrofluorimetrico: molto sensibile → selettivo per molecole che fluorescono (contenenti sistemi ampiamente coniugati)

- rifrattometrico: misura l'indice di rifrazione dell'eluato

di uso universale, ma non applicabile per eluizioni in gradiente

- spettrometro di massa: misura ad ogni istante lo spettro di massa dell'eluato



di uso generale, molto sensibile,
molto utilizzato per l'identificazione della
struttura degli analiti

strumenti combinati LC-MS
(Liquid Chromatography – Mass Spectroscopy)

Vantaggi dell'HPLC

- E' possibile utilizzare tutte le cromatografie: adsorbimento (a fase diretta o a fase inversa), ripartizione, scambio ionico, esclusione molecolare
- E' in grado di analizzare molecole con basso peso molecolare così come materiali ad alto peso molecolare (proteine, polisaccaridi, polimeri)
- L'uso di rivelatori spettrofotometrici, spettrofluorimetrici o di spettrometria di massa – insieme al tempo di ritenzione – permette di identificare gli analiti

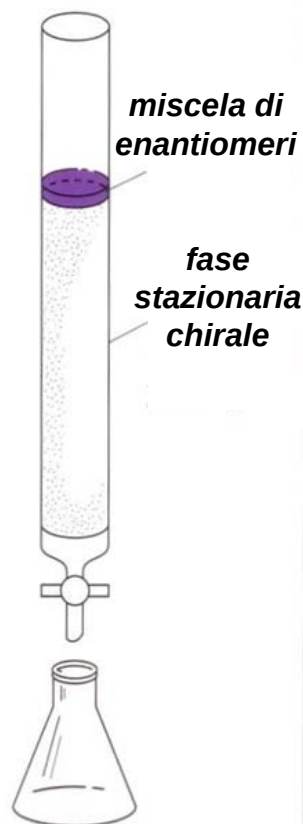


**INDISPENSABILE IN INDUSTRIA, LABORATORI DI RICERCA,
LABORATORI DI ANALISI**

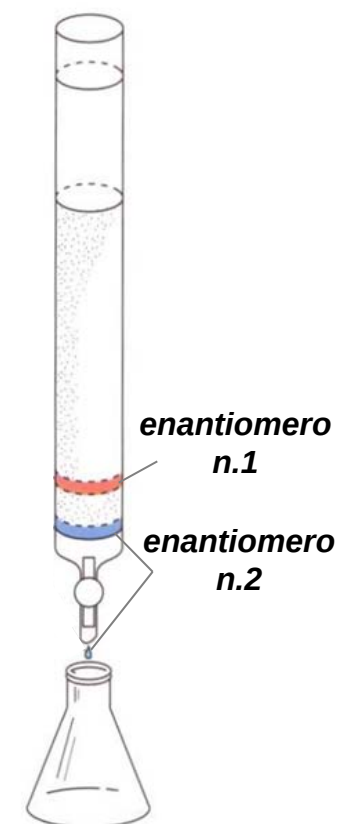
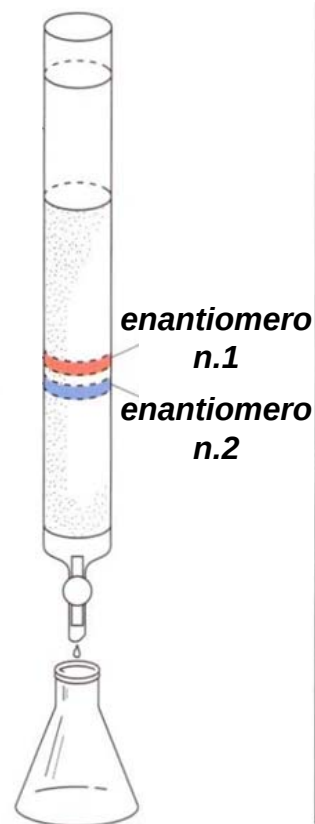
CROMATOGRAFIA SU FASE STAZIONARIA CHIRALE

I due enantiomeri interagiscono diversamente con la fase stazionaria chirale (generalmente funzionalizzata con derivati di oligosaccaridi o amminoacidi, oppure complessi di metalli di transizione) e quindi percorrono la colonna in tempi differenti

Caricamento
campione

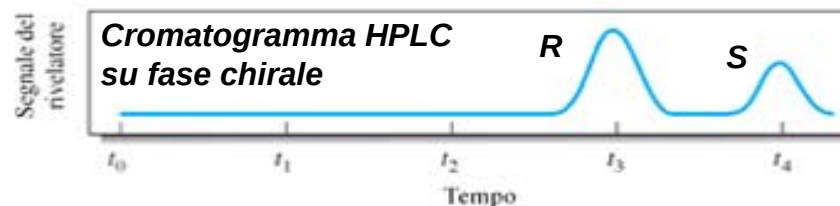


Eluizione



Eccesso enantiomerico (ee) = percentuale di un enantiomero puro purificato da un racemo

$$\%ee = 100 \times \frac{\text{area R (o area S)}}{\text{area R} + \text{area S}}$$



GAS-CROMATOGRAFIA (GC)

GAS-LIQUIDO (GLC)

- Fase mobile gas (funziona solo da carrier)
- Fase stazionaria: liquida non volatile, legata covalentemente su supporto inerte solido
- Cromatografia di ripartizione
- Moltissime applicazioni

GAS-SOLIDO (GSC)

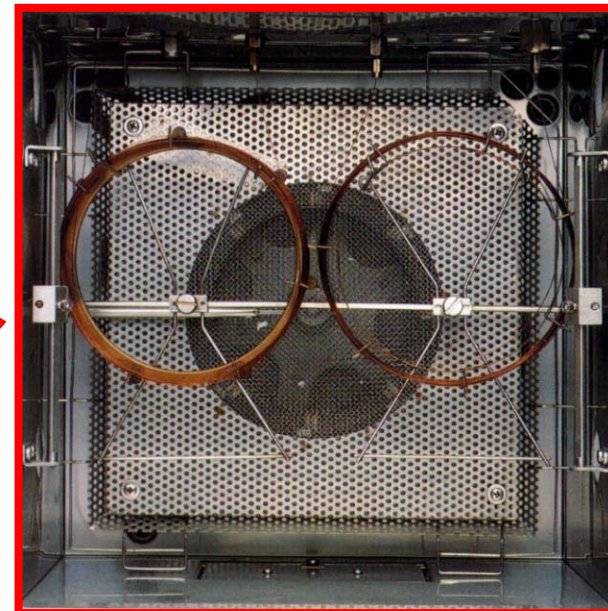
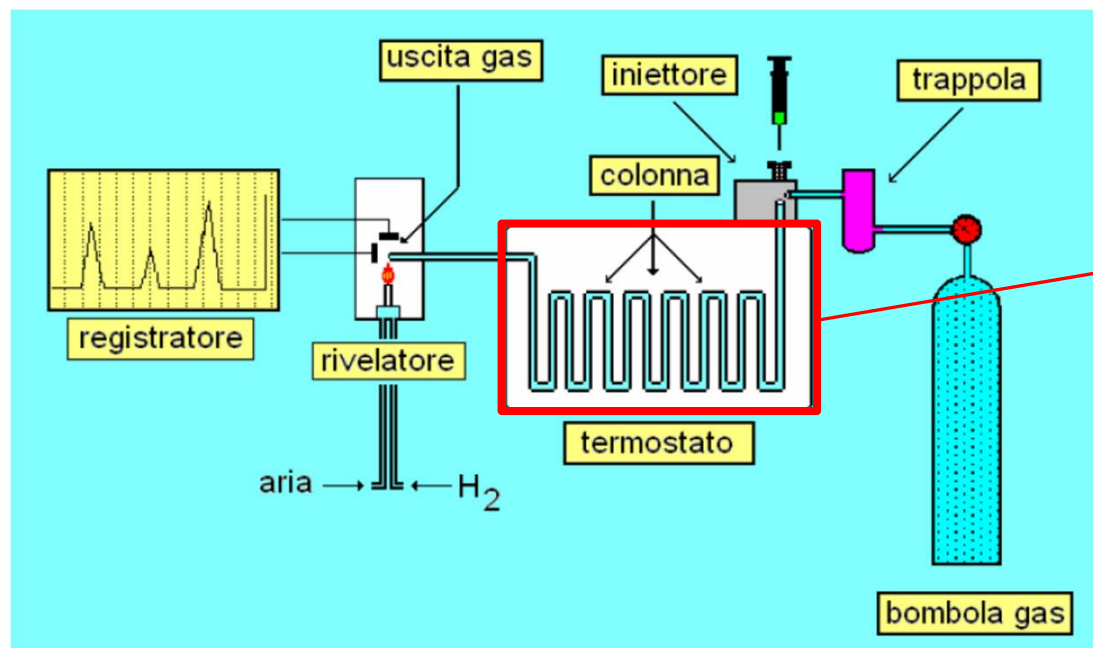
- Fase mobile gas (funziona solo da carrier)
- Fase stazionaria: solida (SiO_2 , allumina, carbone)
- Cromatografia di adsorbimento
- Adatta per la separazione di gas permanenti (H_2 , He, Ar, O_2 , N_2 , CO) o idrocarburi a basso punto di ebollizione

Il campione è vaporizzato e poi iniettato in colonna
i composti iniettabili in un sistema GC devono avere $T_{\text{eb}} < 300^\circ\text{C}$ e non devono essere termolabili, ovvero non devono degradarsi per effetto della temperatura

La fase mobile funziona solo da carrier, la separazione è basata su:

- Interazione con la fase fissa
- Tensione di vapore

Strumentazione GC



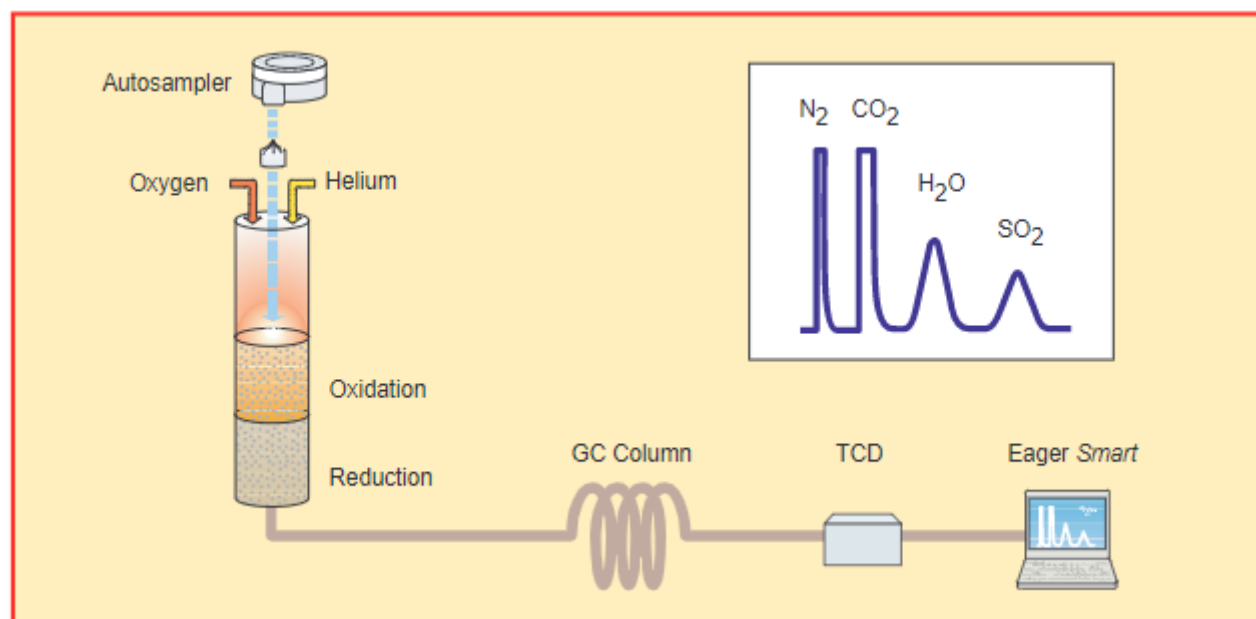
- **rivelatore:**
 - a conducibilità termica
 - a ionizzazione di fiamma
 - spettrometro di massa: fornisce in ogni istante lo spettro di massa dell'eluato

strumenti combinati GC-MS
(Gas-Chromatography – Mass Spectroscopy)

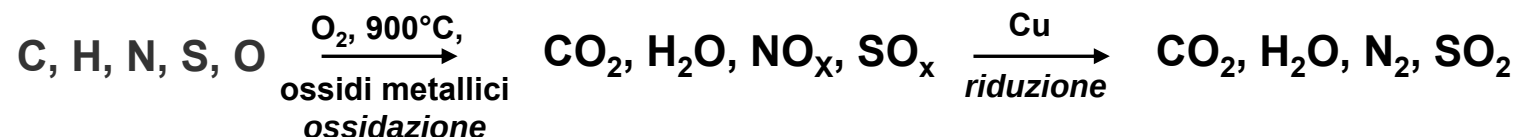
- **colonna cromatografica:** in acciaio o vetro, riutilizzabile
 - **colonne impaccate:** lunghezza 1-2 m, diametro 1-5 mm, N = 7.000-10.000
 - **colonne capillari:** lunghezza 50-100 m, diametro 0.2-0.5 mm, N=100.000-150.000, avvolte a spirale
- **termostato:** essenziale per controllare la temperatura in colonna
→ parametro fondamentale per ottenere una buona separazione dei picchi e riproducibilità

GC & ANALISI ELEMENTARE CHNS

L'analizzatore elementare permette la determinazione della percentuale di C, H, N e S in campioni solidi o liquidi



1) combustione (900°C) di una quantità nota di campione col metodo di Dumas



2) separazione dei gas prodotti tramite colonna gas-cromatografica e analisi qualitativa e quantitativa con un rivelatore a conducibilità termica (TCD)

Riassumendo:

Fase mobile	Strumentazione	Principio di separazione	Tecnica
liquida	colonna	ripartizione	LLC cromatografia liquido/liquido
		adsorbimento	LSC cromatografia liquido/solido
		scambio ionico	IEC cromatografia a scambio ionico
	strato sottile	esclusione	GPC cromatografia a permeazione di gel
		ripartizione	TLC cromatografia su strato sottile
		adsorbimento	TLC cromatografia su strato sottile
	cromatografo liquido	scambio ionico	TLIEC cromatografia a scambio ionico su strato sottile
gassosa	gascromatografo	ripartizione	HPLC cromatografia ad alte prestazioni
		adsorbimento	GLC cromatografia liquido/gas GSC cromatografia liquido/solido

Esercitazione n.4

Tecniche cromatografiche strumentali (alto $N \rightarrow$ alta efficienza)

GC (GLC e GSC): analiti volatili o volatilizzabili
termicamente stabili
non ionici

HPLC: analiti poco o non volatili,
ionici, ionizzabili o non ionici
termicamente instabili;
**enantiomeri (uso fase stazionaria
chirale)**