

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

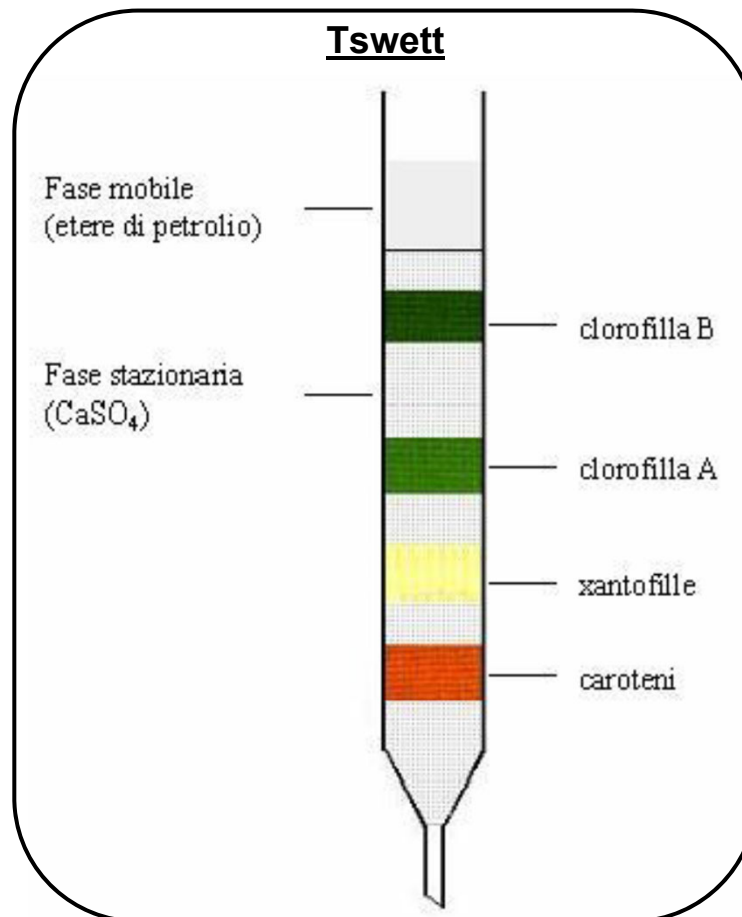
(liquido) → **cromatografia liquida**
HPLC (high-performance liquid chromatography)

(gas) → **gas-cromatografia**

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

Storia della cromatografia

- 1905 (Tswett): separazione su colonna di pigmenti da estratti vegetali
- 1938 (Izmailov & Shraiber): cromatografia liquida su strato sottile (TLC)
- 1944 (Martin & Synge): cromatografia di ripartizione su colonna
- 1950 (Martin & Howard): cromatografia in fase inversa
- 1952 (Martin & James): gas-cromatografia
- 1956 (Van Deemter): teoria della separazione cromatografica



PRINCIPI DELLA CROMATOGRAFIA

la fase stazionaria si trova: {

- all'interno di una colonna → cromatografia su colonna
- supportata su una superficie piana → cromatografia su strato sottile (TLC, Thin Layer Chromatography)

il campione è introdotto (caricato) in una zona ristretta della fase stazionaria (zona di caricamento): alla sommità della colonna o a circa 1 cm dalla base della superficie

la fase mobile viene fatta fluire in continuo attraverso la fase stazionaria

PRINCIPI DELLA CROMATOGRAFIA

Competizione tra forze

- forze che tendono a “legare” (**ritenere**) alla fase stazionaria i singoli componenti della miscela
- forze che tendono a “staccare” e “trascinare” (**far migrare, eluire**) i componenti con la fase mobile



La separazione è basata sulla **differenza di affinità** dei composti da separare per la fase stazionaria e la fase mobile

perchè

La velocità di migrazione relativa è funzione del **potere eluente della fase mobile**, cioè della sua capacità di competere con la forza di ritenzione della fase stazionaria

- quanto più un composto ha affinità per la fase mobile, tanto più in tempi brevi percorrerà tutta la fase stazionaria
- maggiore è l'affinità di un composto per la fase stazionaria, tanto più sarà il tempo necessario affinché esso effettui l'intero percorso cromatografico

Potere eluente della fase mobile
dipende da

Composizione chimica fase mobile
in cromatografia liquida e HPLC

Temperatura
in gas-cromatografia

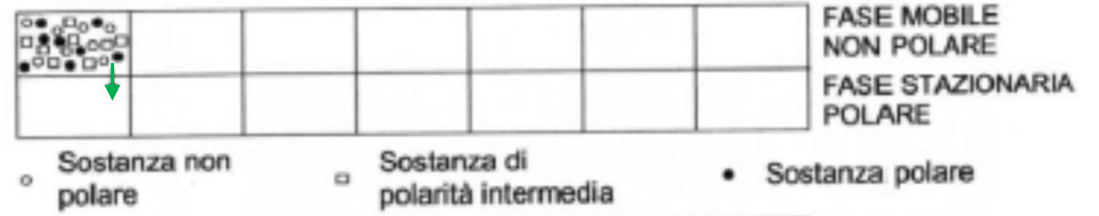
Densità
in SFC

Schematicamente:

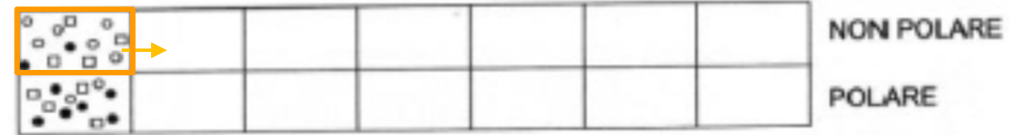
I componenti **più affini alla fase stazionaria** passeranno più tempo in questa fase, quindi si sposteranno **più lentamente**

I componenti **più affini alla fase mobile** si sposteranno invece **più velocemente**

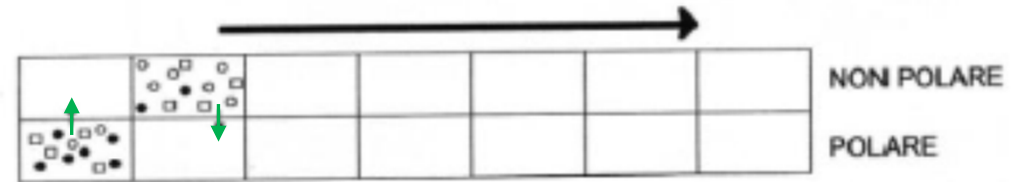
Distribuzione differenziale tra le due fasi



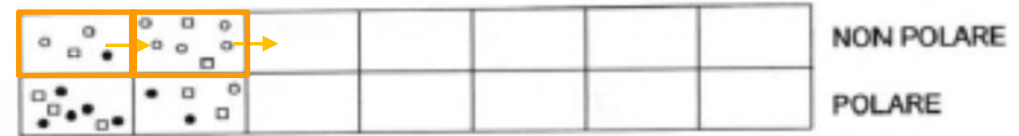
Eluizione



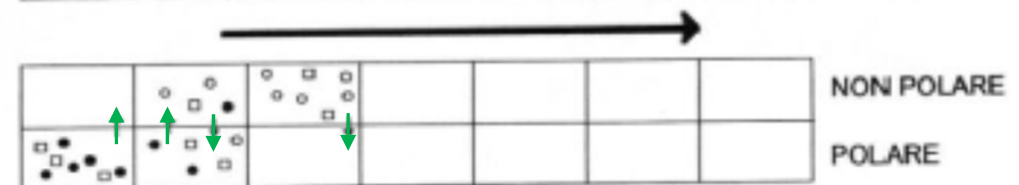
Distribuzione differenziale tra le due fasi



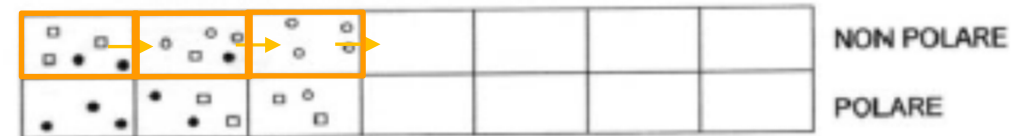
Eluizione



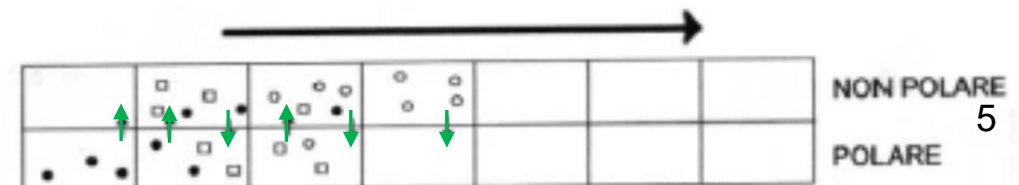
Distribuzione differenziale tra le due fasi



Eluizione



Distribuzione differenziale tra le due fasi



Le interazioni che si verificano tra le sostanze da separare e le due fasi (mobile e stazionaria) sono **deboli:**

- legami a idrogeno
- interazioni dipolo-dipolo
- interazioni dipolo-dipolo indotto
- forze di Van der Waals
- formazione di complessi di interazione
- attrazione coulombiana
- interazioni steriche



I meccanismi di separazione impiegati in cromatografia sono:

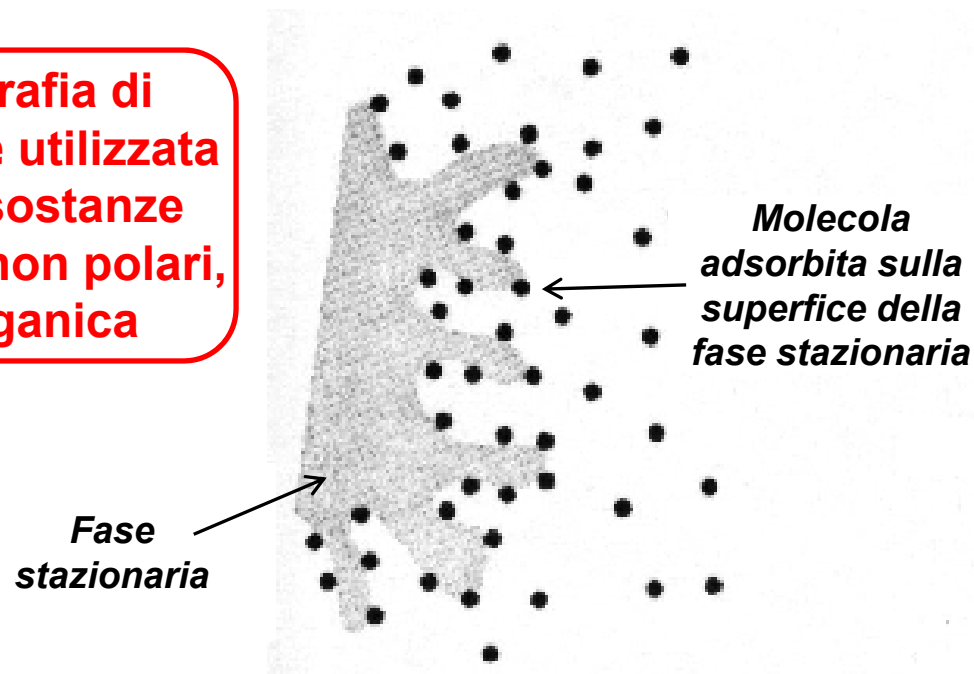
- adsorbimento
- ripartizione
- scambio ionico
- esclusione molecolare

Cromatografia per adsorbimento

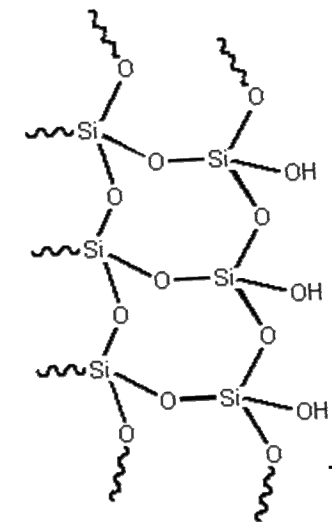
La fase stazionaria è un solido in polvere; sulla superficie dei granuli si trovano siti attivi che possono interagire con le molecole della miscela da separare. Si parla quindi di *cromatografia di adsorbimento*



La cromatografia di adsorbimento è utilizzata per separare sostanze neutre polari o non polari, di natura organica

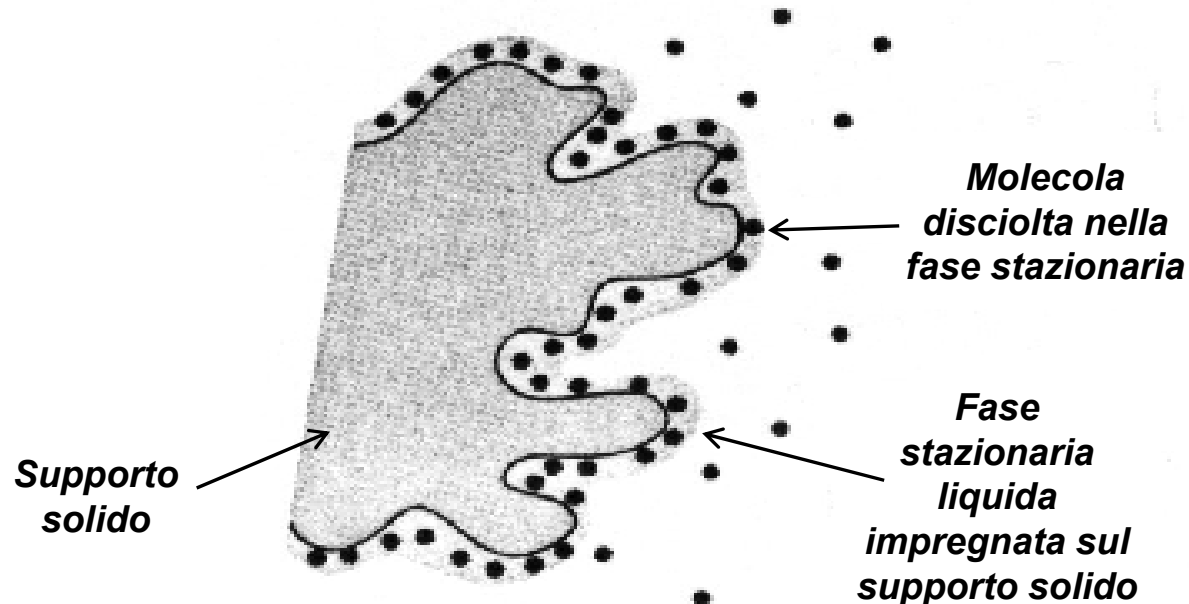


Silice
(fase stazionaria più comune)



Cromatografia di ripartizione

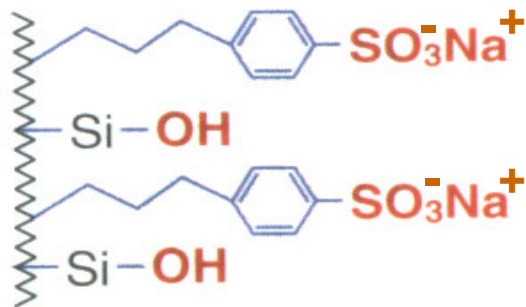
La fase stazionaria è un liquido che impregna un supporto solido granulare inerte o è ad esso chimicamente legato; in questo liquido le molecole da separare sono solubili; la fase stazionaria e la fase mobile devono invece essere immiscibili. Durante l'eluizione le molecole si *ripartiscono* tra le due fasi secondo la diversa solubilità di ognuna



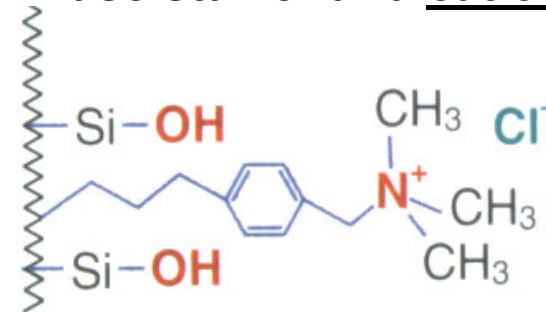
Cromatografia a scambio ionico

La fase stazionaria è costituita da un polimero inerte contenente siti attivi ionizzati o ionizzabili, i cui controioni possono essere scambiati con altri ioni aventi carica dello stesso segno.

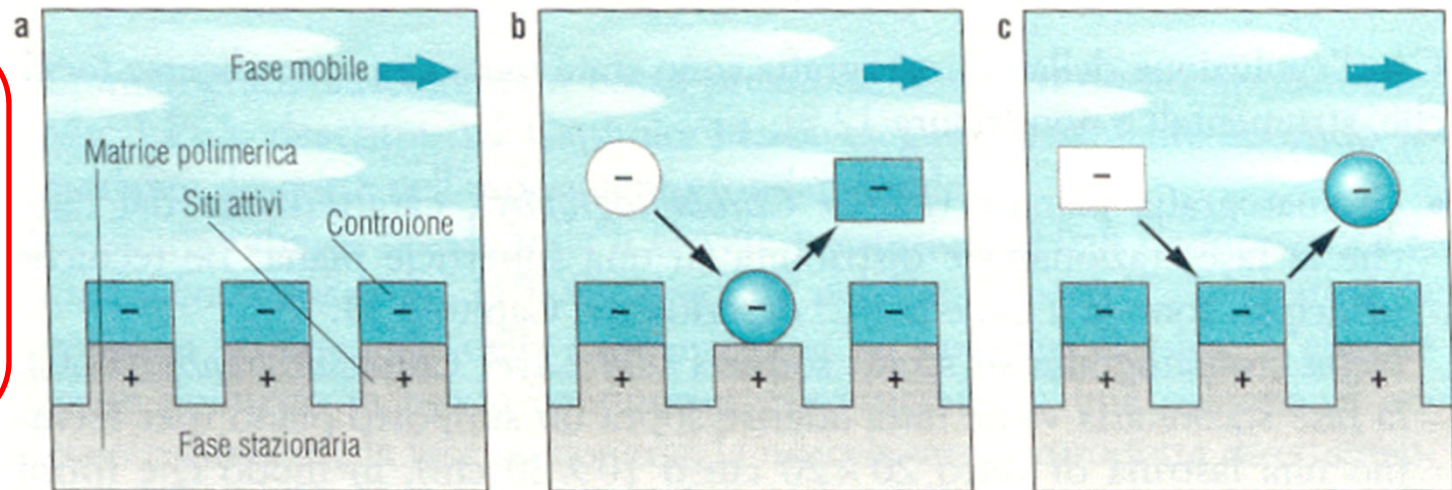
Fase stazionaria anionica



Fase stazionaria cationica

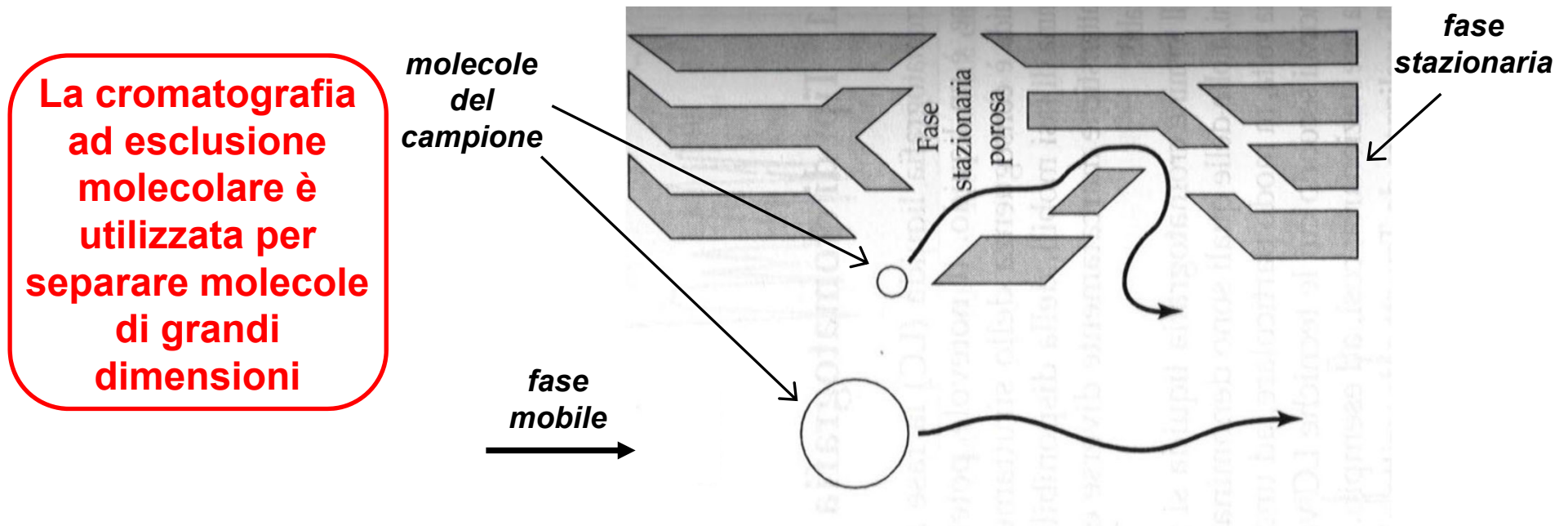


La cromatografia a scambio ionico è impiegata per la separazione di sostanze ioniche o ionizzabili



Cromatografia ad esclusione molecolare

La fase stazionaria è un solido poroso o un gel. Diversamente dalle altre tecniche, questo tipo di cromatografia non dipende dalle interazioni tra i composti da separare con la fase stazionaria e la fase mobile, ma dalle **dimensioni molecolari** dei composti e dalla porosità della fase stazionaria



I composti da separare più piccoli possono penetrare in tutti i pori (o granuli di gel) della fase stazionaria e quindi sono trattenuti più a lungo di quelli più grandi

La fase mobile ha il solo compito di solubilizzare i componenti della miscela e farli muovere lungo la fase stazionaria

- molecole solubili in fasi mobili organiche
 - **Cromatografia di permeazione su gel**
- molecole solubili in fasi mobili acquose
 - **Cromatografia di filtrazione su gel**

COME SCEGLIERE LA CROMATOGRAFIA

