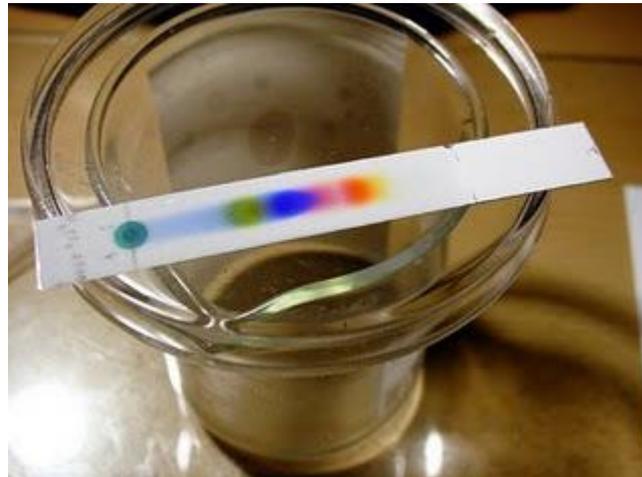
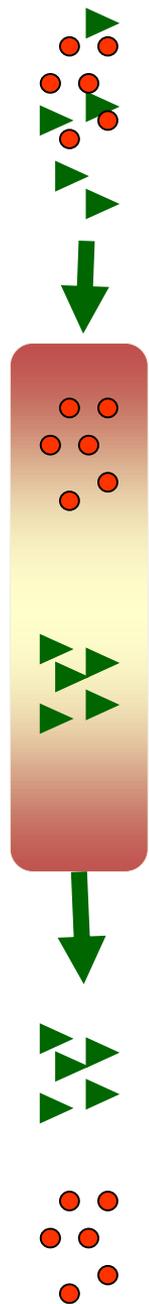


Cromatografia





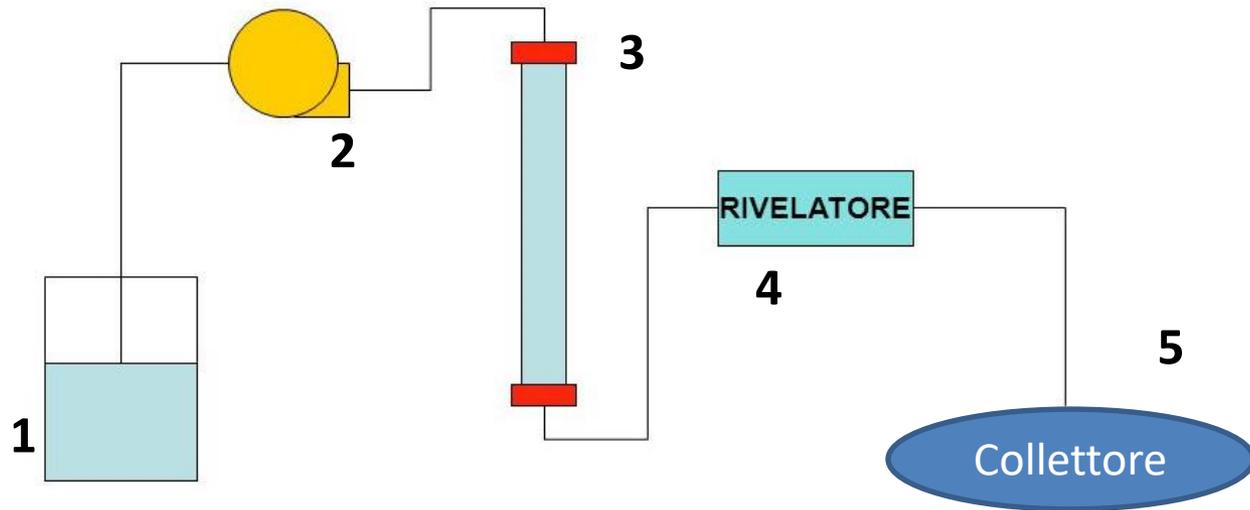
Insieme di tecniche che hanno lo scopo di separare una miscela nei suoi componenti, per permetterne il riconoscimento qualitativo e quantitativo.

Sono basate sulla distribuzione dei vari componenti fra due fasi, una chiamata **fase stazionaria** e l'altra chiamata **fase mobile** (o *eluente*), che fluisce in continuo attraverso la fase fissa.

E' stata usata per la prima volta nel 1906 dal botanico Tswett, per separare i diversi pigmenti presenti nelle foglie. La chiamò *cromatografia* → «scrittura del colore»



Come è costituito, in genere, un sistema cromatografico?



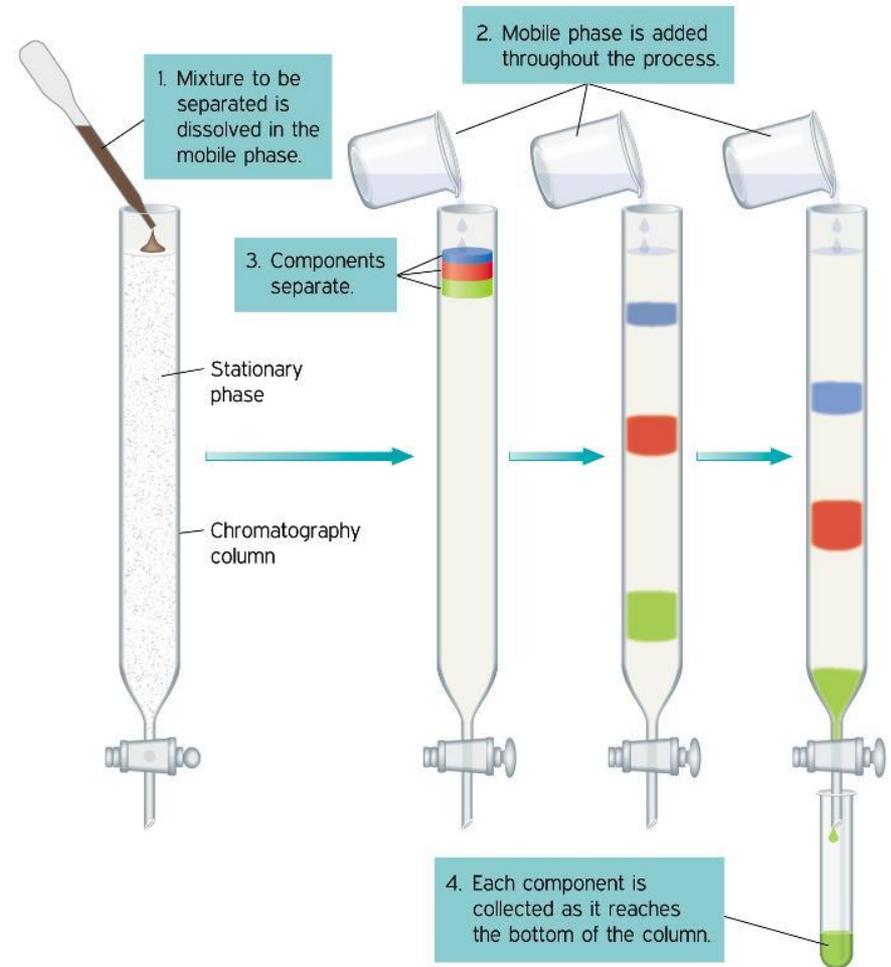
Costituito da:

- 1) Fase mobile
- 2) Pompa peristaltica
- 3) Colonna con fase stazionaria
- 4) Rivelatore
- 5) Collettore di frazioni

Come funziona una separazione cromatografica?

Una volta caricato il campione, sequenza di tre fasi:

1. Eluizione della miscela con la fase mobile attraverso la fase stazionaria
2. Separazione dei componenti in seguito all'eluizione
3. Rivelazione dei composti separati



Principi generali

La separazione avviene perché le molecole da separare hanno un diverso **coefficiente di distribuzione o ripartizione (K_d)**:

$$K_d = \frac{C_S}{C_M} \quad \begin{array}{l} C_S = \text{concentrazione nella fase stazionaria} \\ C_M = \text{concentrazione nella fase mobile} \end{array}$$

$K_d = 1 \rightarrow$ sostanza ugualmente ripartita nelle 2 fasi

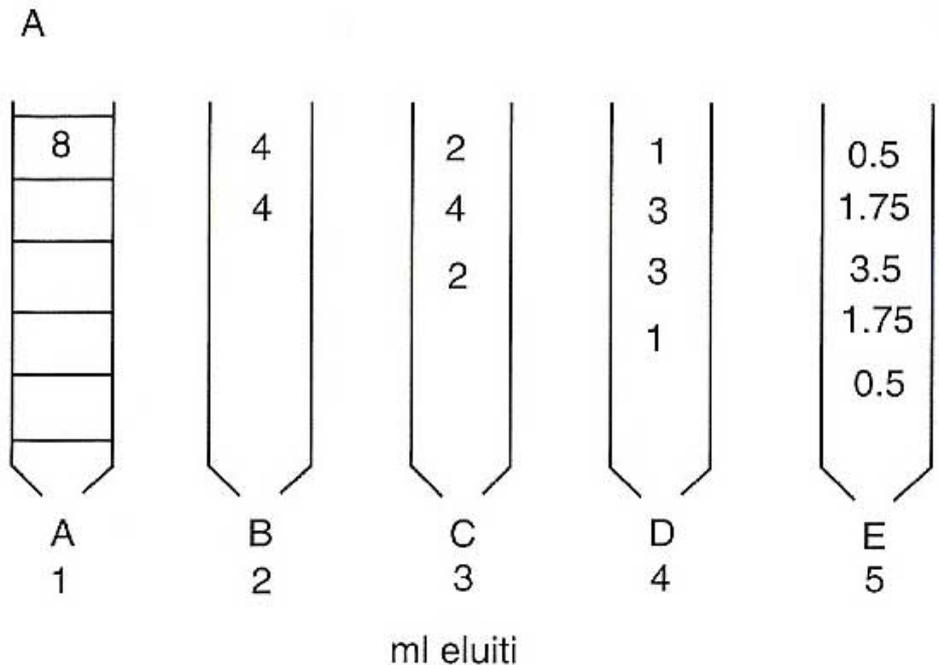
$K_d < 1 \rightarrow$ sostanza maggiormente ripartita nella fase mobile

$K_d > 1 \rightarrow$ sostanza maggiormente ripartita nella fase stazionaria

Al posto di K_d , si può usare anche il **coefficiente effettivo di distribuzione (K_c)**:

$$K_c = \frac{\text{massa}_{(s)} / \text{volume}_{(s)}}{\text{massa}_{(m)} / \text{volume}_{(m)}} \quad \rightarrow \quad K_c = K_d \frac{\text{volume}_{(s)}}{\text{volume}_{(m)}}$$

Il processo cromatografico può essere descritto come una serie di equilibramenti dei componenti della miscela da separare tra la fase stazionaria e quella mobile.



Fonte: Principi di Metodologia Biochimica, Ed. Piccin, 2009

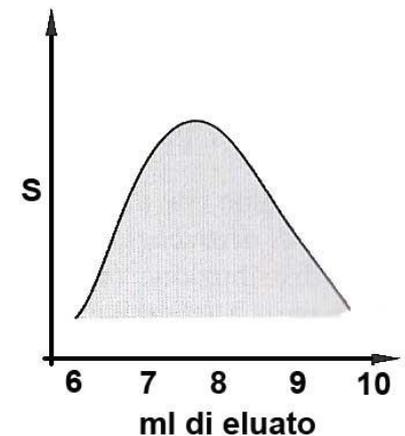
Colonna: 6 cm altezza e 1 cm diametro

Fase mobile liquida circonda fase stazionaria in quantità 1 ml/cm altezza → divisibile in 6 zone

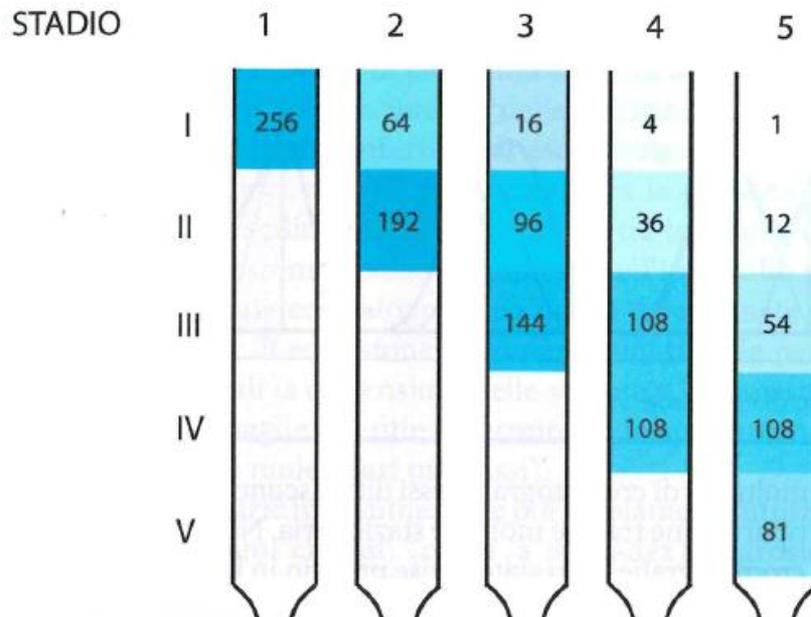
$K_d=1$

Il composto si distribuisce simmetricamente lungo la colonna, con una banda + concentrata al centro secondo una gaussiana.

Grafico [S] in funzione del volume eluato (o tempo di eluizione) → cromatogramma con area picco proporzionale alla concentrazione



Fonte: Principi di Metodologia Biochimica, Ed. Piccin, 2009



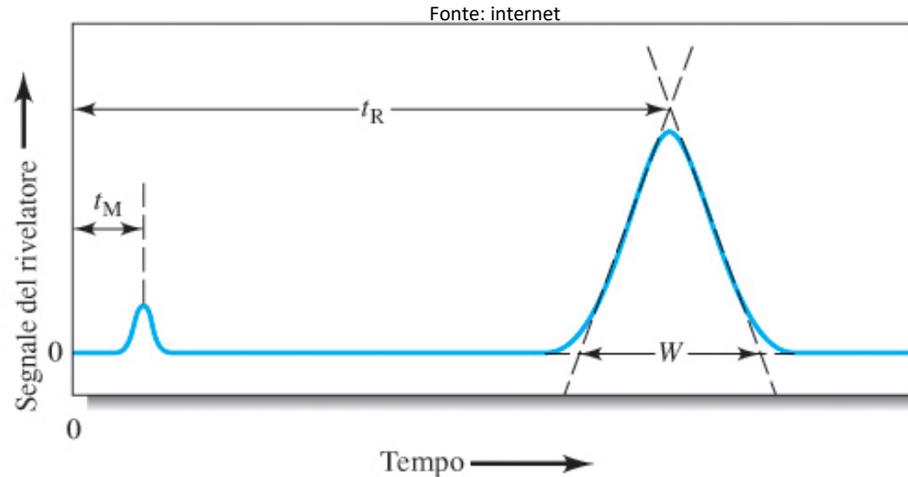
→ Il composto si scioglie di più nella fase mobile

Fonte: Metodologie Biochimiche, Ed. Casa Editrice Ambrosiana, 2012

La massima concentrazione della molecola si ha nel volume IV dello stadio 5.

Se avessimo eseguito una cromatografia con entrambe le molecole, quella con $K = 1/3$ sarebbe uscita prima.

Un parametro per la definizione dell'**efficienza** di una cromatografia (potere di discriminare le varie molecole di una miscela) è il **numero dei piatti teorici**, una rappresentazione teorica degli equilibramenti ai quali vanno incontro le molecole che attraversano il sistema cromatografico.



Maggiore sarà il loro numero, più elevata sarà l'efficienza della colonna cromatografica.

$$N = 16 * (t_R/W)^2 \text{ oppure } N = 5,54 (t_R/W_{1/2})^2$$

t_R = tempo di ritenzione

W = ampiezza alla base del picco

$W_{1/2}$ = ampiezza a metà altezza picco

Anche altri parametri caratterizzano il comportamento del soluto nella colonna.

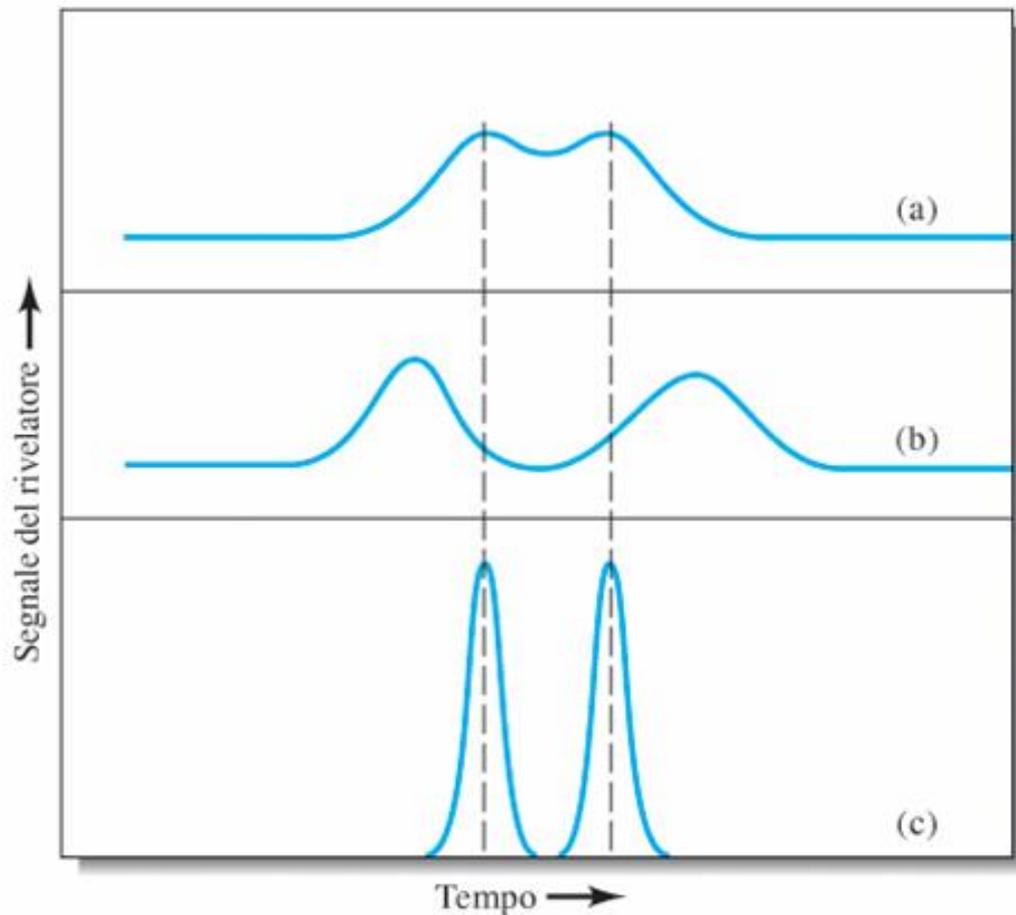
Tempo di ritenzione: tempo che passa tra l'applicazione del campione e il rilevamento dell'uscita di un componente dalla colonna (tempo di ritenzione *assoluto*; si definisce *relativo* quando è riferito a un altro componente di riferimento, o anche il fronte solvente).

Risoluzione: distanza tra il centro di due picchi di eluizione; misura la capacità e l'efficacia di effettuare una separazione netta dei diversi componenti di una soluzione.

Dipende da tre fattori:

1. **Selettività**, capacità di eluire specie chimiche diverse a velocità diverse;
2. **Capacità**, quantità di materiale che può essere risolto senza sovrapporre i picchi;
3. **Efficienza**, capacità del sistema di raggruppare tutte le molecole di un determinato soluto in un ristretto volume di eluizione (dipende dai piatti teorici).

Fonte: Internet



- a) separazione con scarsa risoluzione e basso N
- b) migliora la risoluzione ma è sempre basso N
- c) ottima risoluzione e buono N → **separazione ottimale**

Interazione soluto-fasi

Le interazioni che si verificano tra le sostanze da separare e le due fasi (mobile e stazionaria) sono deboli: se così non fosse non ci sarebbe trattenimento sulla fase stazionaria o eluizione. Sono sfruttate a scopo separativo le seguenti interazioni:

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

Spesso possono essere presenti più tipi di interazione nello stesso processo cromatografico.

Meccanismi della separazione

In base ai tipi di interazione prima descritti possiamo suddividere i meccanismi di separazione impiegati in cromatografia in:

◆ adsorbimento

◆ ripartizione

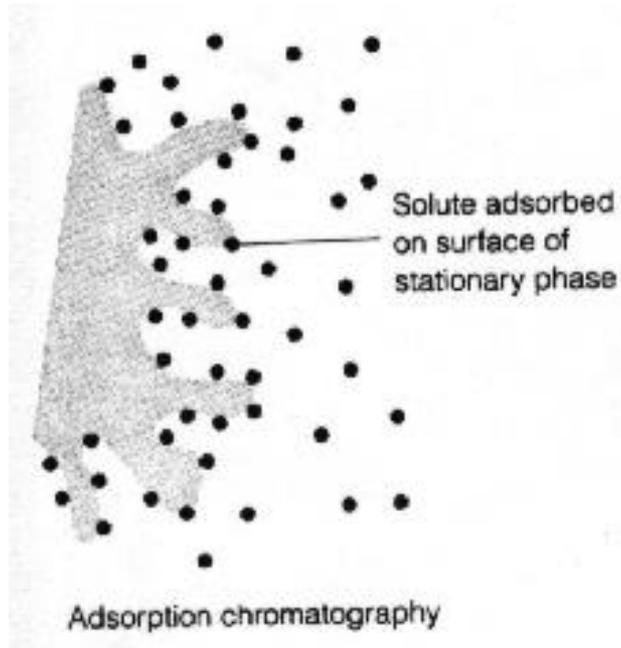
◆ scambio ionico

◆ esclusione

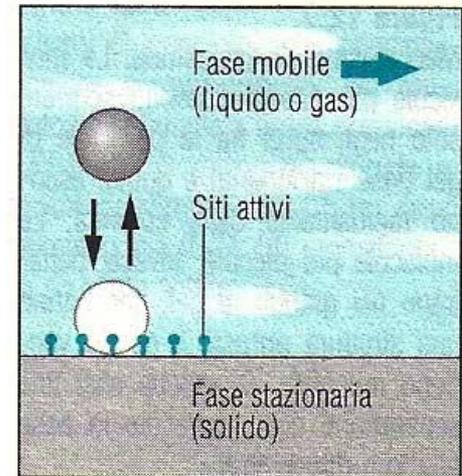
◆ affinità

Adsorbimento

La fase stazionaria è un solido in polvere steso su un supporto; sulla superficie dei granuli si trovano siti attivi che possono stabilire legami deboli (reversibili!) con le molecole della miscela da separare. Si parla quindi di *cromatografia di adsorbimento*, che può essere *gas-solido* o *liquido-solido* a seconda della natura della fase mobile.



Fonte: Analisi chimica strumentale, Ed. Zanichelli, 2000



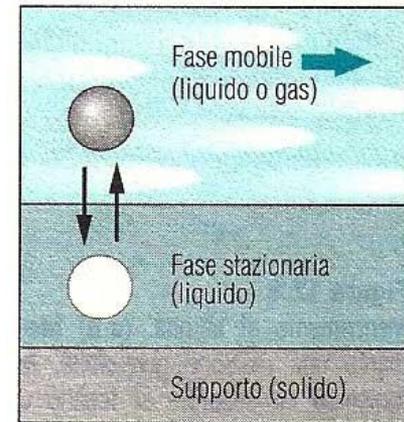
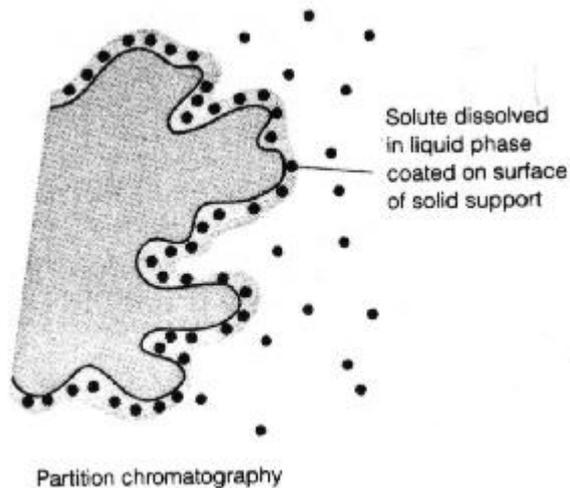
Interazioni idrofobiche

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

Ripartizione

La fase stazionaria è un «liquido» che impregna una matrice inerte solida (supporto): in questo liquido le molecole da separare sono solubili, mentre la fase stazionaria e la fase mobile sono immiscibili.

Durante l'eluizione le molecole si ripartiscono dinamicamente tra le due fasi in base al coefficiente di ripartizione dei soluti nelle 2 fasi: si parla quindi di ***cromatografia di ripartizione (gas-liquido o liquido-liquido)***.



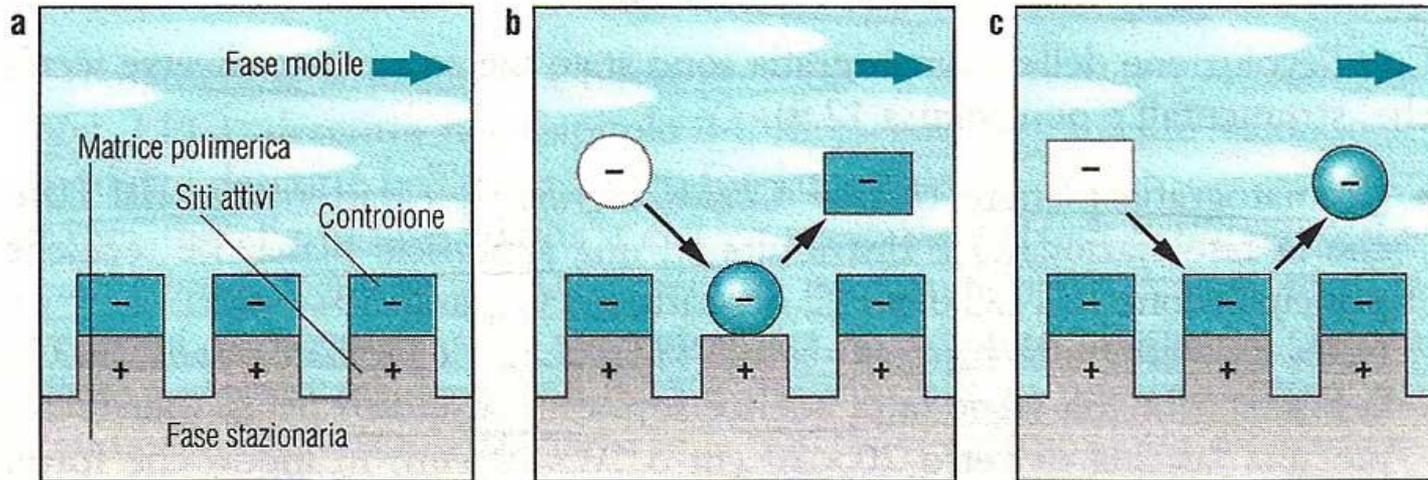
Fonte: Analisi chimica strumentale, Ed. Zanichelli, 2000

Due tipi:

- ***fase normale***, fase stazionaria è più polare (es. acqua) della fase mobile;
- ***fase inversa***, fase stazionaria è meno polare (apolare) della fase mobile. Si tratta della tecnica più comunemente impiegata per la separazione di sostanze organiche

Scambio Ionico

La fase stazionaria è costituita da un polimero inerte contenente siti attivi ionizzati, i cui controioni possono essere scambiati con altri ioni aventi carica dello stesso segno. Il meccanismo di separazione è basato sulla competizione per i siti di scambio, presenti sulla fase stazionaria, tra i controioni presenti nella fase mobile e quelli presenti nel campione. Si parla di **cromatografia di scambio ionico**.



Fonte: Analisi chimica strumentale, Ed. Zanichelli, 2000

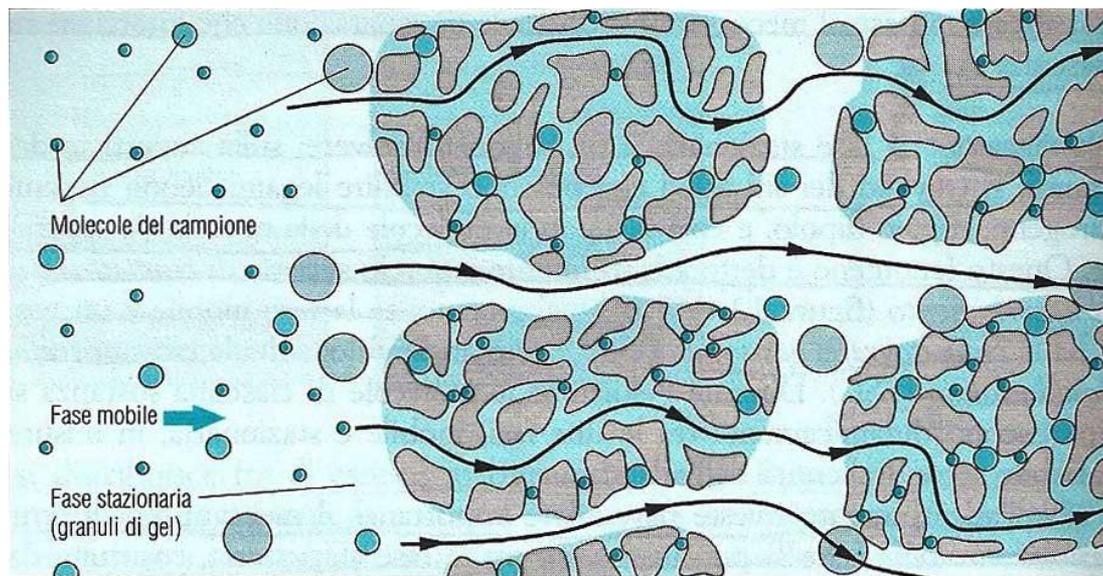
Due tipi di scambio ionico:

- a) **Resine cationiche**, deboli o forti → scambiano cationi (sono cariche negativamente)
- b) **Resine anioniche**, deboli o forti → scambiano anioni (sono cariche positivamente)

Esclusione molecolare o gel filtrazione

La fase stazionaria è un solido poroso o un gel con pori di dimensioni variabili in base alla composizione chimica e alla preparazione della matrice.

Le molecole dell'analita, disciolte nella fase mobile, penetrano nei pori se le loro dimensioni sono compatibili e vi rimangono per un certo tempo; le molecole più grandi sono invece escluse dai pori ed escono dalla colonna in tempi brevi → **le molecole piccole sono ritardate dal gel**



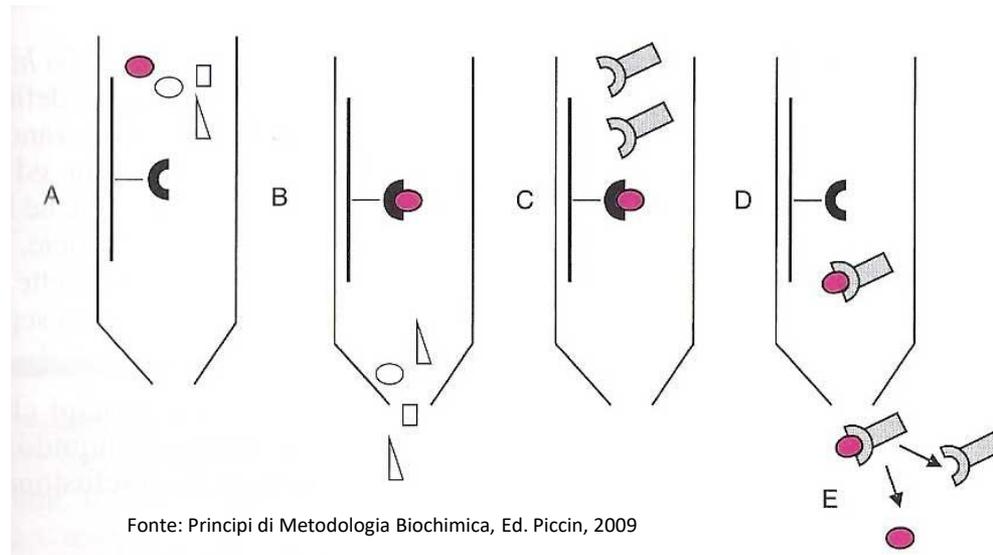
Fonte: Analisi chimica strumentale, Ed. Zanichelli, 2000

Si parla di ***cromatografia di esclusione o gel filtrazione***.

La tecnica è impiegata per la separazione di molecole di grandi dimensioni (es miscela di proteine).

Affinità

In questo caso si utilizzano reazioni di tipo biochimico, reversibili e molto specifiche, in modo che le molecole da separare interagiscano con la fase stazionaria e si ottenga così l'eluizione selettiva di alcuni componenti della miscela. Si parla di ***cromatografia di affinità***.



Sulla fase stazionaria è immobilizzato un ligando (es. anticorpo) → caricando il campione in colonna, solo la molecola che si lega al ligando verrà trattenuta. La proteina viene poi eluita con una opportuna fase mobile.

La cromatografia di affinità è impiegata nella separazione di molecole di interesse prevalentemente biochimico.

Diversi tipi di cromatografia

In base allo stato fisico della fase mobile possiamo classificare le tecniche cromatografiche in:

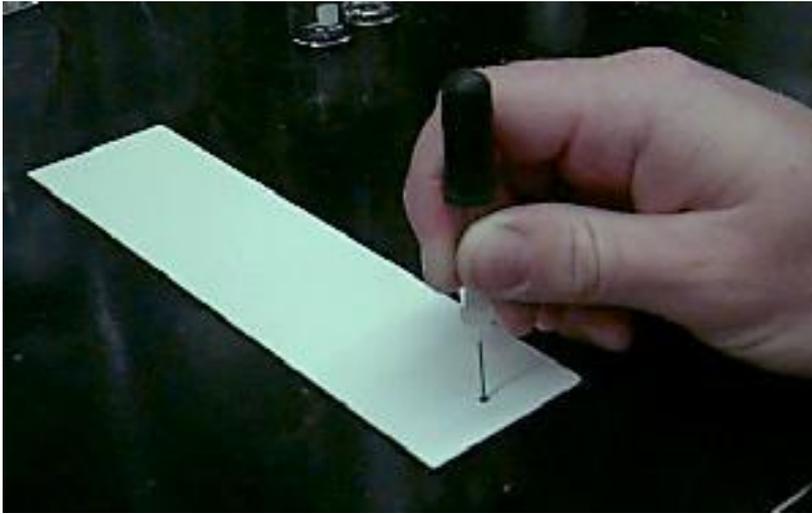
- Cromatografia Liquida (LC): la fase mobile è un liquido nel quale sono solubili i componenti della miscela da separare; la fase stazionaria deve essere insolubile nella fase mobile.
- Gas Cromatografia (GC): la fase mobile è un gas che funge da carrier per i componenti della miscela.

In base alla forma del letto cromatografico si possono identificare:

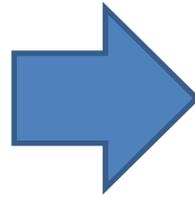
- Cromatografia su colonna: fase stazionaria è contenuta all'interno di una colonna cilindrica.
- Cromatografia planare: la fase stazionaria è distribuita su una superficie piana, che può essere un supporto cartaceo (*cromatografia su carta*, PC) o una lastrina in vetro o altri materiali (*cromatografia su strato sottile*, TLC)

Cromatografia planare

Esecuzione semplice: la miscela da separare va depositata sulla superficie, posandone con un tubo capillare una goccia su una linea che segna l'inizio del processo di eluizione.



Fonte: Internet



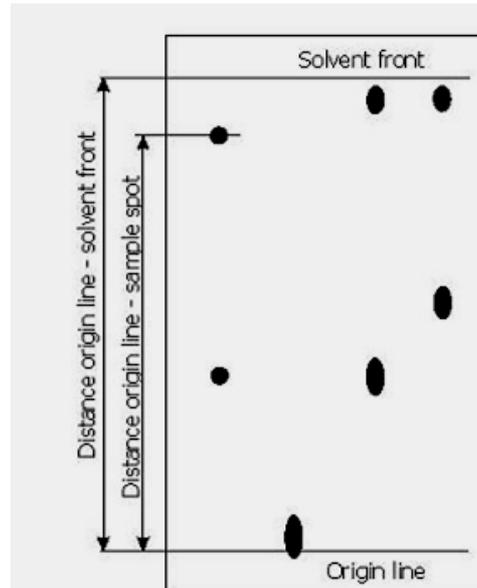
Il foglio o la lastrina si pongono in una vaschetta contenente la fase mobile che per gravità (modalità *discendente*), per capillarità (modalità *ascendente*) o per diffusione laterale (modalità *orizzontale*) fluisce sulla fase stazionaria trascinando gli analiti e separandoli tra loro.

Il risultato è spesso visualizzabile sotto forma di macchie colorate, ognuna dovuta ad un componente della miscela.

Il riconoscimento delle sostanze può avvenire effettuando separazioni su miscele standard → il parametro che caratterizza i soluti separati è il cosiddetto Rf o **fattore di ritardo**, ottenuto misurando la distanza percorsa dal centro della macchia e confrontandola con la distanza percorsa dal fronte dell'eluente:

$$Rf = \frac{d_{analita}}{d_{eluente}}$$

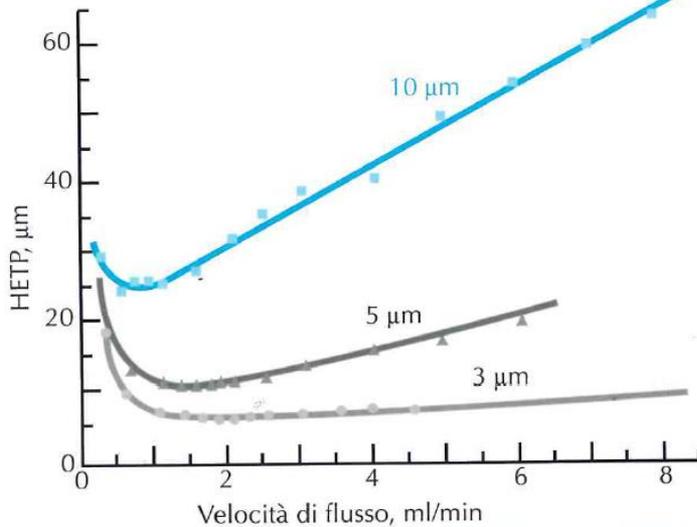
Il valore di Rf degli analiti è quindi sempre compreso tra 0 e 1.



Cromatografia su colonna: HPLC (High Pressure/Performance Liquid Chromatography)

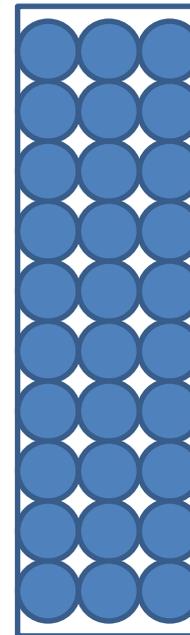
Caratterizzata da eluizioni ad alte pressioni, grazie all'utilizzo di particelle di fase stazionaria indeformabili di **piccole dimensioni (3-5-10 μm)**.

L'utilizzo di particelle di piccole dimensioni permette di **umentare il numero di piatti teorici (N)**, migliorando l'efficienza di separazione.

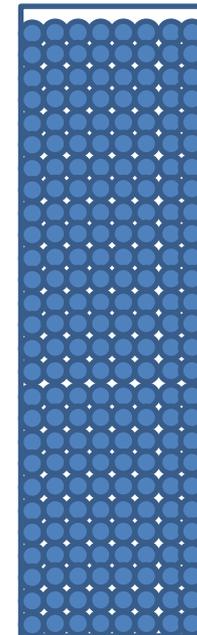


A parità di flusso, particelle più piccole dimostrano una HETP minore

1-Particelle grandi

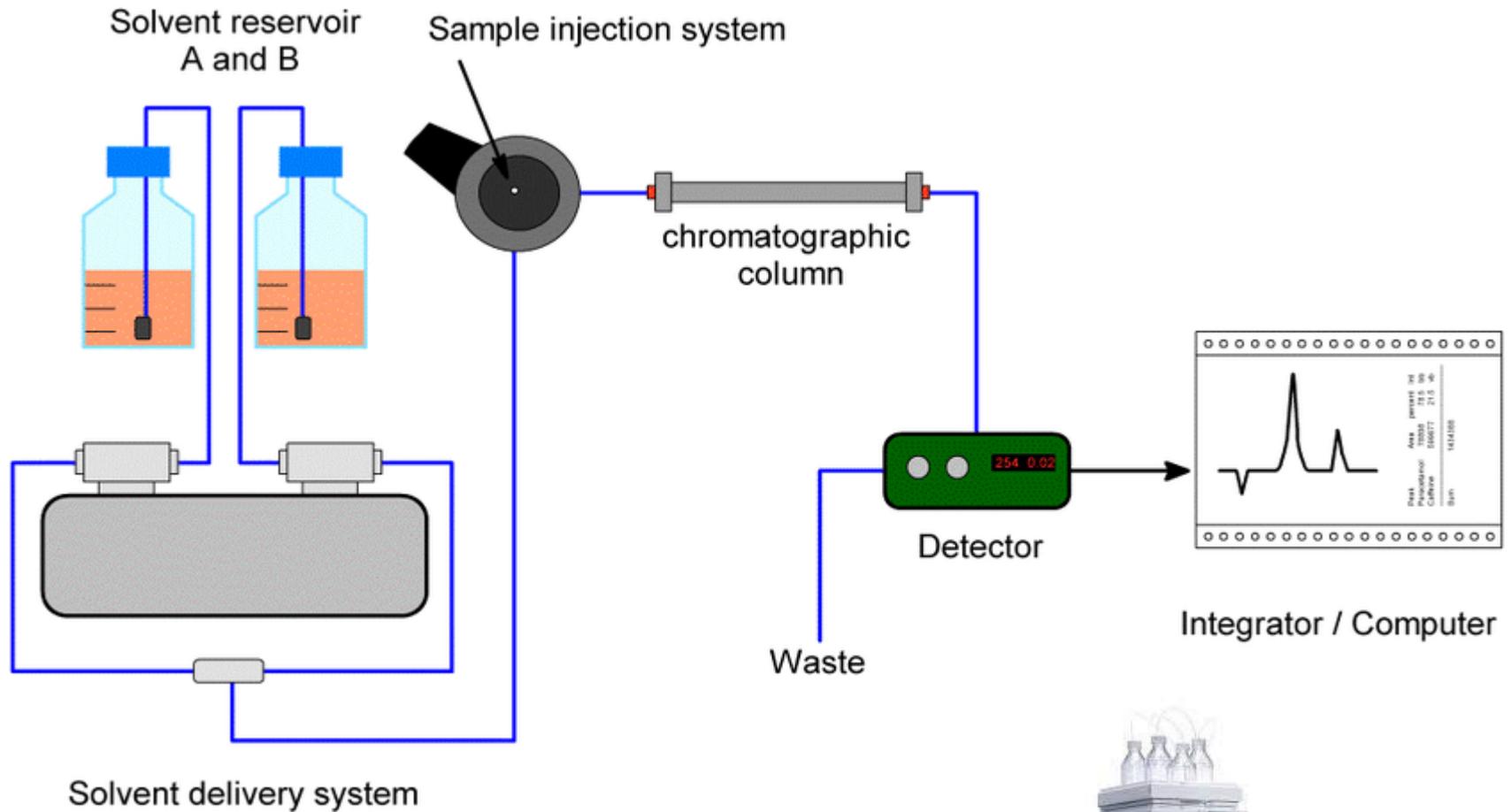


2-Diametro 3 μm



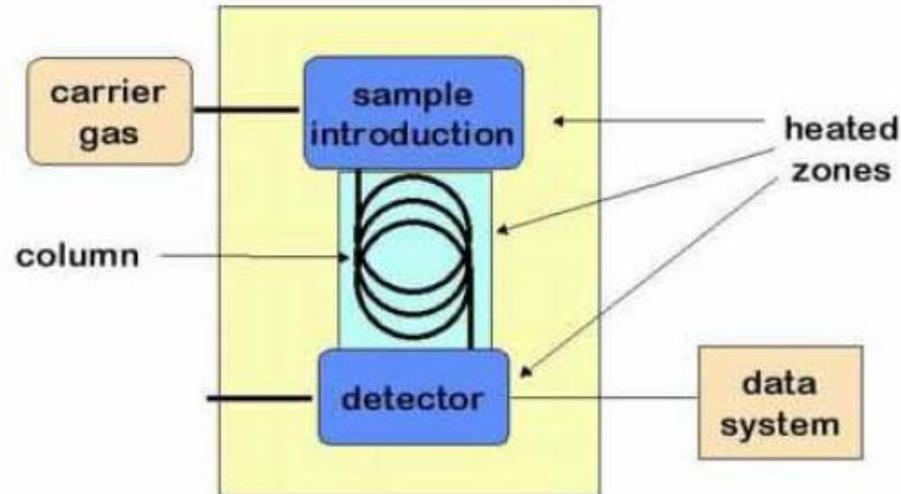
$$N_2 > N_1$$

Come è fatto un HPLC?



Gas cromatografia (GC)

Permette la separazione di sostanze gassose o gassificabili variando la temperatura.



Si possono separare sostanze appartenenti a varie classi tra cui:

- aromi (terpeni, esteri)
- idrocarburi a catena corta
- acidi carbossilici
- composti di interesse biochimico

I composti iniettabili in un sistema GC devono avere $T_{eb} < 300^{\circ}\text{C}$ e non devono essere *termolabili*