

CROMATOGRAFIA LIQUIDA AD ALTA PRESSIONE

(HPLC)

DESCRIZIONE GENERALE DELLO STRUMENTO

L'HPLC (High Performance Liquid Chromatography) è uno strumento analitico derivato dalla cromatografia classica e si basa sugli stessi principi.

Nella cromatografia classica il componente principale è la colonna che contiene la fase stazionaria all'interno della quale scorre la fase mobile rappresentata dall'eluente.

Il passaggio dell'eluente avviene tramite la spinta esercitata dalla colonna di liquido costituente la fase mobile e quindi il processo, se la fase stazionaria non è abbastanza porosa, può essere anche molto lento. La separazione dei componenti avviene tramite interazioni che si creano fra i costituenti della miscela e le due fasi. Le interazioni possono essere di tipo elettrostatico, dipolo-dipolo, forze di Van Der Waals oppure tramite un meccanismo di scambio ionico. Questo dipende dalle proprietà sia delle due fasi sia della miscela da separare.

Nell'HPLC la forza che permette all'eluente di scorrere nella colonna, è rappresentata dalla pressione che è applicata da una pompa in testa alla colonna e forza la fase mobile a scorrere all'interno della fase stazionaria. Questo permette non solo di rendere il processo più rapido ma permette anche di ottenere un maggior numero di piatti teorici il che vuol dire una migliore risoluzione.

GENERALITÀ SULL'HPLC

Le prime cromatografie liquide sono state eseguite in colonne di vetro che avevano un diametro interno dai 10 a 50 mm. Le colonne erano impaccate con 50-500 cm di particelle solide rivestite con un liquido adsorbente che formava la fase stazionaria. Per aumentare in modo notevole la velocità di flusso di questo tipo di fase stazionaria, la grandezza della particella del solido era di 150-200 μm . Comunque nella migliore delle ipotesi il flusso massimo non superava i 10 ml il minuto.

Tentativi portati avanti per aumentare la velocità di flusso, come l'applicazione di pompe a vuoto o di alte pressioni in testa alla colonna, modificando la cromatografia classica, non portarono a risultati perché insieme all'aumento del flusso si otteneva un aumento della larghezza del piatto teorico.

Il piatto teorico di una colonna cromatografia corrisponde a quel tratto di colonna nel quale una specie chimica si trova in equilibrio fra le due fasi (stazionaria e mobile) prima che l'eludente la trascini ad uno stadio successivo.

Il numero di piatti teorici (N) caratteristici di una colonna è dato dalla relazione:

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

Dove W è l'ampiezza del picco e T_v è il tempo di ritenzione, in altre parole il tempo che intercorre fra il momento dell'iniezione e la cresta del picco.

Se si usa, nell'equazione precedente, al posto di T_v il tempo di ritenzione corretto (ovvero il tempo di ritenzione relativo fra il picco in analisi e il picco di una sostanza non trattenuta, che quindi esce subito

dalla colonna), che chiameremo T_r^1 , otteniamo l'equazione esprime il numero di piatti *effettivi* N^1 .

$$N_{\text{eff}} = 16 \left(\frac{T_r^1}{W} \right)^2$$

Di significato analogo a N è anche l'altezza equivalente del piatto teorico HEPT (abbreviato con H) che si esprime come riportato nell'equazione seguente.

$$H_{\text{eff}} = \frac{L}{N_{\text{eff}}}$$

L'esperienza dimostra che l'efficienza di una colonna è direttamente collegata al numero di piatti teorici. Con l'aumentare di questi ultimi i diversi componenti di una miscela escono dalla colonna in bande più compatte.

Per migliorare l'efficienza di una colonna, bisogna quindi fare in modo che il numero di piatti N sia più grande possibile. Ciò può essere conseguito o aumentando la lunghezza della colonna od ottimizzando tutti quei parametri che determinano il valore di N (e quindi anche di H), primo fra tutti la velocità lineare (in mm/sec) della fase mobile. Quest'ultimo parametro può anche essere espresso in termini di flusso (ml/min).⁴

I primi sviluppi positivi nella cromatografia liquida furono fatti dopo che si ipotizzò e si constatò che la diminuzione dello spessore del piatto teorico si poteva ottenere impaccando la colonna con particelle di diametro più piccolo.

Solo alla fine degli anni '60 è stata sviluppata una tecnologia adatta alla fabbricazione di particelle di grandezza variabile dai 5 ai 10 μm per

impaccare le colonne. Il nome di High Performance Liquid Chromatography (HPLC) serve quindi a distinguere questa nuova tecnologia cromatografica dalla cromatografia classica, ormai usata quasi esclusivamente per scopi preparativi.²

La **Figura 1** mostra i cinque tipi di HPLC più usati che comprendono:

- 1) Cromatografia di ripartizione o cromatografia liquido-liquido
- 2) Cromatografia di adsorbimento o cromatografia solido-liquido
- 3) Cromatografia a scambio ionico
- 4) Cromatografia di permeazione gel
- 5) Cromatografia di gel-filtrazione

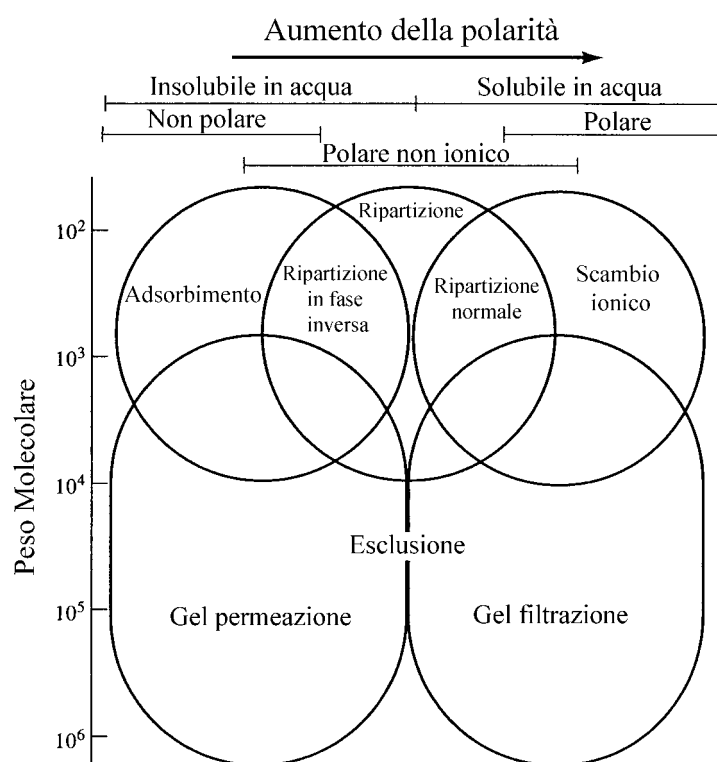


Figura 1. Applicazione dei 5 tipi di HPLC più usati, in base al peso molecolare e alla polarità dei composti da separare

Dalla figura si può comprendere che a volte i vari tipi di cromatografia liquida tendono ad essere complementari. Per esempio, per analiti che hanno peso molecolare più grande di 10000 sono spesso usati due tipi di cromatografia di esclusione: la permeazione nel gel per specie non polari e la gel filtrazione per composti polari o ionici.

Per specie ioniche che hanno peso molecolare più basso, il metodo di scelta è generalmente la cromatografia a scambio ionico.

Specie piccole, polari ma non ioniche sono trattate con la cromatografia di ripartizione.

Per la sua versatilità e ampia applicabilità l'HPLC è attualmente una delle tecniche di separazione più ampiamente usate a scopi qualitativi e quantitativi.

STRUMENTI

Nella moderna cromatografia liquida, sono richieste pressioni di pompaggio di diverse centinaia di atmosfere, per raggiungere velocità di flusso sufficienti a permettere una buona separazione in colonne impaccate con particelle di diametro variabile dai 3 ai 10 μm . Come conseguenza l'equipaggiamento di una moderna apparecchiatura per HPLC è notevolmente più costoso rispetto a quello della cromatografia classica. La **Figura 2** mostra i più importanti componenti di un tipico strumento per HPLC.

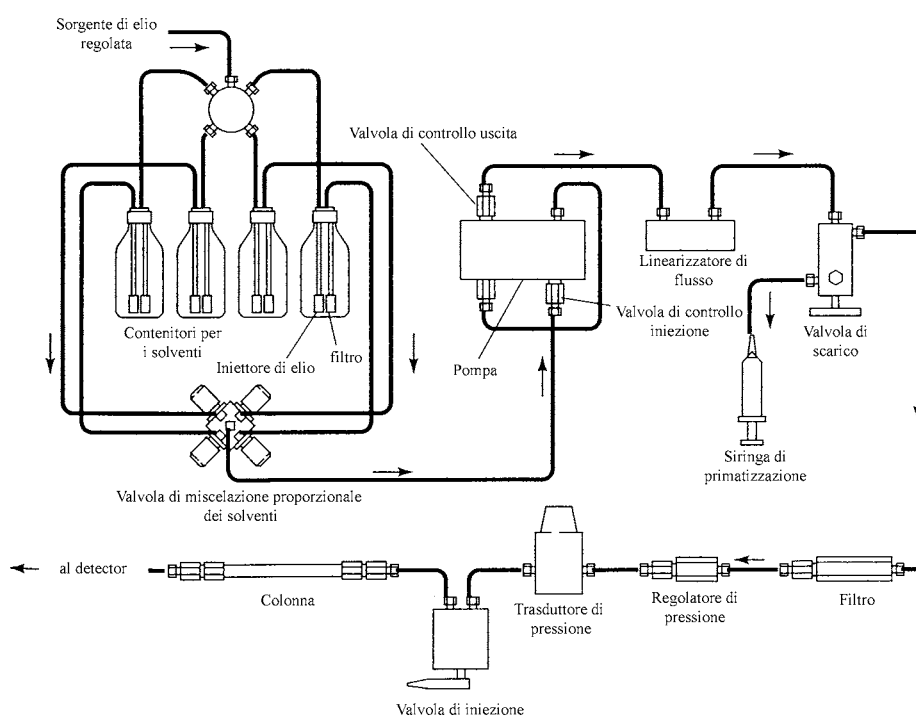


Figura 2. Schematizzazione di un tipico strumento per HPLC.

I CONTENITORI PER LA FASE MOBILE E I MODERNI SISTEMI DI TRATTAMENTO DEI SOLVENTI.

Un moderno apparato per HPLC è equipaggiato con uno o più contenitori in vetro o acciaio, generalmente bottiglie, contenenti 500 ml o più di solvente.

In genere sono presenti dei dispositivi per degassare i solventi e le soluzioni eluenti ed eliminare eventuali particelle indissolte. La preparazione della soluzione e la sostituzione di un contenitore di solvente, producono bolle e scorie, che se entrassero in colonna potrebbero causare uno slargamento delle bande; inoltre si avrebbe anche una compromissione dell'efficienza del sistema di pompaggio.

La macchina è quindi provvista di un sistema di degassaggio che può consistere in una pompa a vuoto, un sistema di distillazione, un sistema per il riscaldamento e l'agitazione della soluzione o, come mostrato in **Figura 2**, un sistema di degassaggio tramite gas inerte, in cui un gas non solubile nel solvente da degassare (generalmente elio), viene fatto gorgogliare in piccole bolle all'interno del contenitore per portare via i gas disciolti.

Un'eluizione con un singolo solvente di composizione costante viene detta isocratica.

Nella eluizione tramite gradiente invece, due o più solventi di differenti polarità, vengono mescolati in proporzioni prestabilite. Il rapporto fra i due solventi viene fatto variare durante l'eluizione, a volte in modo continuo, a volte attraverso una serie di steps, durante i quali la percentuale dei solventi rimane costante per un certo periodo di tempo, per poi cambiare nuovamente.

L'eluizione in gradiente generalmente aumenta l'efficienza della separazione, così come la variazione della temperatura influisce sulla gas cromatografia.

Le apparecchiature più moderne sono spesso equipaggiate con valvole proporzionali, che introducono i liquidi in colonna con rapporti che variano in maniera continua.

I SISTEMI DI POMPAGGIO

Le caratteristiche cui devono soddisfare le pompe impiegate per l'HPLC sono molto restrittive e includono:

- Generazione di pressioni maggiori di 6000 psi (lb/in²)
- Non generare un pressione pulsatile in uscita
- Velocità di flusso variabili in un range di 0.1-10 ml/min
- La riproducibilità del flusso non deve variare più dello 0.5%
- Resistenza alla corrosione verso una grande varietà di solventi

Sono impiegati due tipi di pompe meccaniche: una del tipo a siringa guidata a vite oppure una pompa alternativa (o a pistone), mostrata in **Figura 3**.

La prima produce un flusso senza pulsazione e la velocità del flusso è facilmente controllabile; ha però lo svantaggio di un alto volume di riempimento, che diventa un problema quando devono essere sostituiti i solventi.

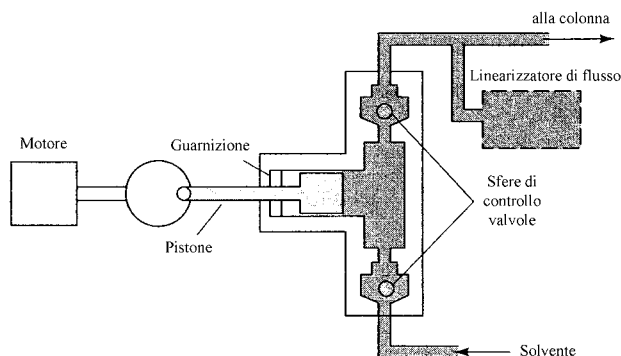
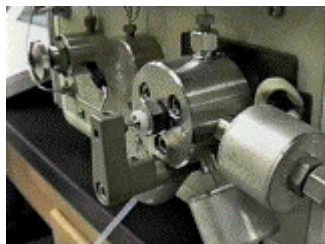


Figura 3. Pompa alternativa per HPLC.

Le pompe a pistone sono quelle più comunemente usate e sono costituite da una piccola camera cilindrica che è riempita e vuotata dal movimento di un pistone. Il pompaggio produce un flusso pulsatile che deve essere successivamente linearizzato. I vantaggi delle pompe a pistone sono un piccolo volume interno, la capacità di generare alte pressioni in uscita (superiori a 10000 psi), rapida adattabilità al cambiamento dei gradienti nel corso dell'analisi, flusso costante e inoltre sono molto poco sensibili alla viscosità del solvente e alla pressione in testa alla colonna.

Alcuni strumenti sono equipaggiati con una pompa pneumatica, che nella sua forma più semplice consiste in un contenitore di solvente collassabile su se stesso contenuto in un recipiente che può essere riempito di gas compresso. Il gas spinge le pareti del contenitore collassabile che sprema il solvente in colonna. Le pompe di questo tipo sono semplici, poco costose e danno un flusso costante e lineare, hanno però come inconveniente che la velocità del flusso è molto influenzata dalla viscosità della fase mobile. Inoltre non sono adatte ad analisi in gradiente.

Si deve notare che le alte pressioni generate dalle pompe per la cromatografia in fase liquida, non sono a rischio di esplosione, poiché i liquidi non sono molto comprimibili. Quindi la rottura di un componente può solo provocare una perdita di solvente e soltanto se esso è infiammabile ci può essere l'eventuale pericolo di incendi.⁵

SISTEMA DI INIEZIONE DEL CAMPIONE

Sebbene nella cromatografia in fase liquida sia spesso usata l'iniezione tramite siringa attraverso un setto costituito di materiale elastomero, questa procedura non è molto riproducibile e si può usare solo a pressioni di lavoro inferiori a 1500 psi.

Nella iniezione stop-flow il flusso del solvente viene bloccato per permettere l'asportazione di una piccola quantità di solvente in testa alla colonna e il caricamento del campione, sempre in testa, tramite una siringa.

Comunque il metodo di caricamento più usato in HPLC è quello che usa il sampling loop, come mostrato in **Figura 4**. Questi dispositivi sono equipaggiati di loop intercambiabili di capacità variabile dai 5 ai 500 μl . La caratteristica principale del sistema di iniezione tramite loop è l'alta riproducibilità dei volumi iniettati.

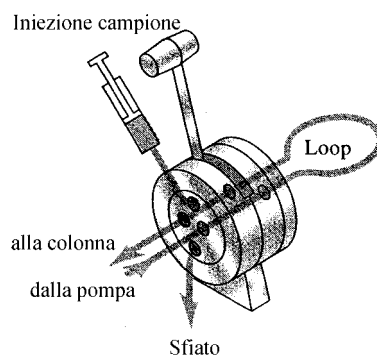
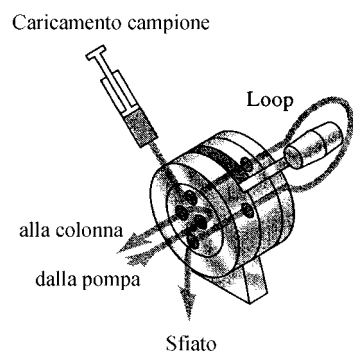


Figura 4. Sistemi di iniezione per HPLC.

COLONNE PER HPLC

Le colonne per HPLC sono di solito costruite in acciaio, ma esistono anche in vetro ricoperto di metallo impiegate soprattutto quando si lavora a pressioni inferiori a 600 psi. La lunghezza delle colonne varia da 10 a 30 cm e il diametro interno da 4 a 10 mm. Le colonne sono generalmente impaccate con particelle di diametro variabile dai 5 ai 10 μm . Colonne di questo tipo arrivano generalmente a contenere dai 40000 ai 60000 piatti per metro di lunghezza.

Recentemente sono state introdotte sul mercato microcolonne lunghe dai 3 ai 6.5 cm e aventi un diametro interno variabile da 1 a 4.6 mm. Queste colonne che sono impaccate con particelle di diametro variabile dai 3 ai 5 μm , contengono più di 100000 piatti per metro e hanno il vantaggio di una maggiore velocità operativa e di un minore consumo di solvente. Quest'ultima proprietà è di notevole importanza perché i solventi ad alta purezza richiesti per questo tipo di cromatografia sono molto costosi. Con questo tipo di colonne vi sono esempi di separazione di 8 composti in un tempo di 15 secondi con una colonna lunga 4 cm con un diametro interno di 4 mm e impaccata con particelle di 3 μm di diametro.

Il più comune materiale usato per impaccare le colonne per HPLC è la silice, preparata per agglomerazione di particelle di diametro inferiore al micron sotto condizioni che portano a particelle più grandi con diametri altamente uniformi. Le particelle risultanti sono spesso rivestite

con sottili film di composti organici, che sono legati alla superficie tramite legami chimici o fisici.

Altri materiali usati per impaccare le colonne sono le particelle di albumina, di polimeri microporosi e resine a scambio ionico.

COLONNE DI GUARDIA

Spesso, per aumentare la vita di una colonna analitica, in testa ad essa è applicata una colonna di guardia che rimuove dai solventi particelle indissolte e contaminanti. Inoltre nella cromatografia liquido-liquido, la colonna di guardia serve a saturare la fase mobile con la fase stazionaria così che sia minimizzata la perdita di fase stazionaria dalla colonna analitica. La composizione di una colonna di guardia dovrebbe essere simile a quella della colonna analitica; la grandezza delle particelle è comunque maggiore per minimizzare la caduta di pressione agli estremi.

TERMOSTATO DELLA COLONNA

Per molte applicazioni non è necessario il controllo preciso della temperatura e le colonne vengono fatte operare a temperatura ambiente. Spesso comunque i migliori cromatogrammi si ottengono mantenendo la temperatura della colonna costante e vicina alla temperatura ambiente. I moderni strumenti sono equipaggiati con riscaldatori di colonne che possono mantenere una temperatura in un range variabile da qualche decina di gradi a 150°C.

RIVELATORI

Per l'HPLC non sono disponibili rivelatori universali ed altamente sensibili come quelli impiegati per la gas cromatografia. Quindi il sistema di rivelazione usato dipende dalle esigenze dettate dalla natura del campione.

I rivelatori più ampiamente usati per la cromatografia liquida si basano sulla misura dell'assorbimento della luce ultravioletta o della luce visibile da parte del campione. Generalmente vengono indagate lunghezze d'onda che vanno dai 200 ai 280 nm poiché molti gruppi funzionali dei composti organici assorbono in questa regione. La sorgente usata può essere il mercurio ma si usano anche filamenti in tungsteno o deuterio equipaggiati con filtri di interferenza che eliminano le radiazioni indesiderate. I rivelatori spettrofotometrici sono molto più versatili di quelli fotometrici e sono quelli più usati negli strumenti a più alte prestazioni. Spesso sono strumenti detti a *diode array* che possono mostrare l'intero spettro di assorbimento di un analita che entra in colonna.

Un altro tipo di rivelatore che ha trovato molte applicazioni si basa sul cambiamento dell'indice di rifrazione del solvente causato dalle molecole di analita. In contrasto con la maggior parte dei rivelatori precedentemente indicati, questo è meno selettivo perché l'indice di rifrazione è in generale meno specifico per le varie sostanze e può essere influenzato anche da soluti presenti nella fase mobile. Lo svantaggio di questo tipo di rivelatore è inoltre una limitata sensibilità, oltre che la poca selettività.

Altri tipi di rivelatori, usati comunque raramente, sono quelli che si basano sulla misura della conducibilità della fase mobile, e quelli che eseguono misure potenziometriche e amperometriche. In **Figura 5** è rappresentato lo schema di un rivelatore amperometrico.

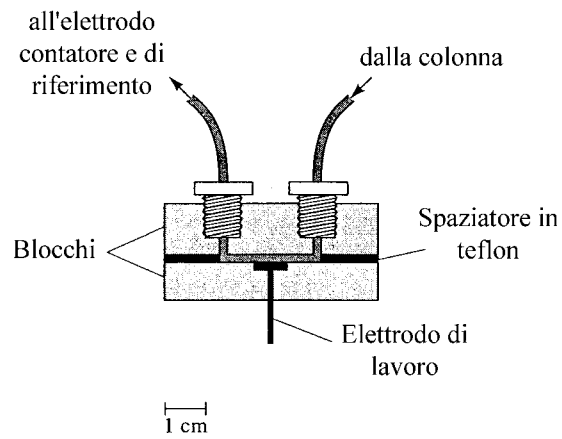


Figura 5. Rivelatore amperometrico per HPLC.