

## IMPACCAMENTO DELLE COLONNE

In HPLC si utilizzano riempimenti con granulometria decisamente più fine rispetto a quella usata in cromatografia classica. Ciò consente di migliorare le prestazioni ed in particolare di incidere sull'efficienza della separazione, poiché la diminuzione del diametro medio delle particelle comporta anche un più alto numero di piatti teorici.<sup>1</sup>



**Figura 6.** Colonne per HPLC.

Due sono i tipi di impaccamenti usati in cromatografia liquido-liquido:

1. *Riempimento con particelle di tipo pellicolare*, in cui le particelle sono costituite di un nucleo non poroso di forma sferica (solitamente vetro) rivestito da un sottile strato di materiale microporoso, avente uno spessore di 1-3  $\mu\text{m}$ , il diametro medio dell'intera particella risulta di 40-50  $\mu\text{m}$ . Le colonne impiegate hanno una lunghezza di 50-100 cm.
2. *Riempimento con particelle microporose*, dove le particelle hanno forma irregolare o sferica ed hanno diverse porosità; sono disponibili con diametri medi che vanno da 3 a 10  $\mu\text{m}$  ed oltre. Si utilizzano in genere con colonne tanto più corte tanto più fine è la loro

granulometria: ad esempio colonne da 10-25 cm con particelle di 10  $\mu\text{m}$ , fino a 3-4 cm per le fasi da 3  $\mu\text{m}$ .<sup>1</sup>

Le microparticelle rappresentano, rispetto alle fasi pellicolari, un sensibile passo avanti dal punto di vista della efficienza. Inoltre le microparticelle hanno una capacità più elevata, per cui sono adatte (al contrario delle pellicolari) anche all'analisi preparativa; viceversa, dal punto di vista pratico sono molto più difficili da impaccare ed hanno tendenza al rigonfiamento.



**Figura 7.** Fasi stazionarie per HPLC.

## **IMPACCAMENTI NORMALI ED IN FASE INVERSA**

Le cromatografie di ripartizione si distinguono anche in base alla relazione che esiste fra le polarità della fase mobile e della fase stazionaria.

I primi lavori fatti sulla cromatografia liquida furono portati avanti su fasi stazionarie altamente polari come glicol trietilenico o acqua; la fase mobile era costituita da un solvente relativamente poco polare come l'esano o l'etere isopropilico. Per ragioni storiche questo tipo di

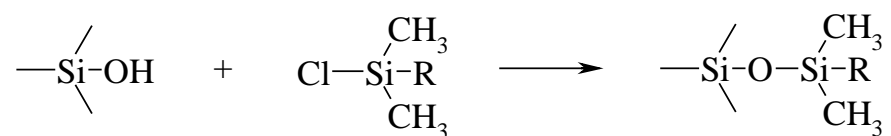
cromatografia è detta *cromatografia in fase normale*. Nella *cromatografia in fase inversa* la fase stazionaria è apolare e la fase mobile è un solvente polare. <sup>2</sup>

Nella cromatografia a fase normale il componente meno polare della miscela da separare è eluito per primo ed aumentando la polarità della fase mobile diminuisce il tempo di eluizione. Al contrario nella cromatografia in fase inversa il componente più polare è quello che viene eluito per primo ed un aumento della polarità della fase mobile fa aumentare il tempo di ritenzione.

E' stato stimato che più di tre quarti di tutte le separazioni eseguite in HPLC siano portate avanti su colonne in fase inversa, impaccate con octil- o octadecil- silossani. Durante tali separazioni i gruppi, costituiti da idrocarburi a lunga catena, sono allineati paralleli gli uni agli altri e perpendicolari alla superficie delle particelle della fase stazionaria e conferiscono l'aspetto delle setole di un pennello alla superficie di tali particelle. Le fasi mobili più usate in questo tipo di separazioni sono soluzioni acquose contenenti solventi come metanolo, acetonitrile o tetraidrofurano in varie concentrazioni.

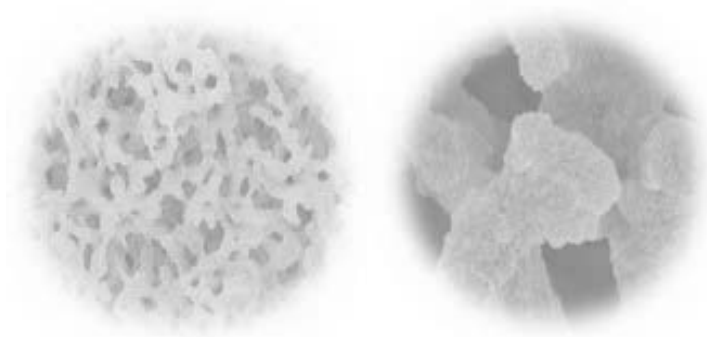
## **MATERIALI PER L'IMPACCAMENTO DELLE COLONNE E FATTORI DETERMINANTI L'EFFICIENZA DI SEPARAZIONE.**

I materiali per impaccare questo tipo di colonne sono preparati per reazione di un organoclorosilano con i gruppi -OH formati sulla superficie di particelle di silice per idrolisi a caldo in acido cloridrico diluito. Il prodotto ottenuto è un organoclorosilano. Se si considera la reazione fra un gruppo SiOH presente sulla superficie di una particella di silice, si può scrivere:



dove R è generalmente una catena ramificata di un gruppo da otto a diciotto atomi di carbonio. Altri gruppi funzionali legati alla superficie delle particelle di silice possono essere ammine alifatiche, eteri, nitrili e gruppi aromatici. Da questo si deduce che si possono ottenere fasi stazionarie con diverse caratteristiche di polarità.<sup>3</sup>

Il gel di silice è il materiale adsorbente più utilizzato in cromatografia liquida. Le nuove silici modificate per fase inversa (RP, Reversed Phase) sono caratterizzate da una diversa tecnologia di legame della fase inversa tesa ad ottenere una ricopertura ad alta densità e distribuita in maniera più uniforme.



**Figura 8.** Fasi stazionarie di silice al microscopio elettronico.

E' possibile ottenere rivestimenti altamente uniformi solo utilizzando un supporto siliceo con superficie regolare, pori uniformi (diametro, volume, forma) e distribuzione omogenea della porosità. In RP

si parla di nuova generazione di silice riferendosi sia all'utilizzo di silice ultra-pura con parametri geometrici (diametro delle particelle e dei pori) monodispersi, sia a una nuova tecnologia di legame della fase idrofobica.

La silice è costituita come noto da atomi di silicio legati tridimensionalmente con atomi di ossigeno, la catena è saturata con gruppi -OH (silanoli) alle estremità. In HPLC la silice può essere impiegata sia in forma diretta che in forma legata (RP, Reversed Phase). Le proprietà fisiche del materiale possono essere fortemente modificate durante la sintesi delle particelle, la cui forma può risultare irregolare o sferica. La produzione della silice irregolare prevede:

1. L'idrolisi completa del materiale di partenza che può essere sodio silicato, tetralcossisilano o tetraclorosilano
2. Uno stadio di condensazione per formare acido polisilicico
3. Disidratazione

Il prodotto viene poi macinato finemente e suddiviso per granulometria con metodi gravimetrici, di sedimentazione o per separazione con aria.

Per la silice sferica la fase di condensazione differisce da quella precedente in quanto la polimerizzazione avviene in una soluzione etanolo/acqua/ammoniaca la cui composizione soprattutto per quanto riguarda il rapporto acqua/silano viene attentamente regolata allo scopo di controllare la crescita delle sfere attorno alle particelle primarie.

Aggiungendo opportuni additivi si possono conferire alle particelle solide diverse caratteristiche fisiche le quali daranno luogo a diversi comportamenti cromatografici (selettività) in HPLC.

Le caratteristiche principali sono:

1. *Forma: sferica o irregolare.* Le fasi sferiche danno una maggiore efficienza (piatto teorico più basso di circa il 10-20%) e una migliore riproducibilità di impaccamento.
2. *Dimensione delle particelle.* La silice irregolare, in quanto non caratterizzata da una sola dimensione, ha una granulometria puramente nominale che arriva come minimo a 10  $\mu\text{m}$ . La silice sferica viene prodotta in granulometrie fino a 3  $\mu\text{m}$ . La più diffusa per scopi analitici è 5  $\mu\text{m}$ . Scendendo con la granulometria aumenta la contropressione della colonna.
3. *Dimensione dei pori.* Varia da 60 a 150 Angstrong per scopi analitici tradizionali; da 300 a 500 Angstrong per analisi di peptidi e proteine piccole e da 1000 a 5000 Anstrong per macromolecole.
4. *Area superficiale.* Espressa in  $\text{m}^2/\text{g}$ , questa risulta essere direttamente proporzionale a  $k^1$  e alla capacità di carico ed inversamente proporzionale alla dimensione dei pori. Le silici irregolari hanno tipicamente valori molto elevati (400-500  $\text{m}^2/\text{g}$ ).
5. *Distribuzione e volume dei pori.* Una distribuzione uniforme dei pori è essenziale per avere picchi cromatografici simmetrici, perciò la curva di distribuzione dovrebbe essere la più stretta possibile. La lunghezza dei pori influisce sul meccanismo di separazione degli analiti in quanto nelle silici microporose la velocità di ingresso e uscita dai pori, anche in rapporto alla velocità di flusso e alla

viscosità della fase mobile, dà un contributo importante all'allargamento dei picchi. I pori dovrebbero essere corti e numerosi mentre dovrebbero essere il più possibile assenti le comunicazioni tra singoli pori. Inoltre, a seconda del metodo di produzione, diversi tipi di silice avranno caratteristiche chimiche superficiali diverse in termini di comportamento acido/basico.<sup>4</sup>

Si può dedurre che le diversità esistenti tra silici sferiche anche della stessa granulometria e dimensione dei pori possono essere talmente elevate da impedire qualsiasi tipo di comparazione.

Nonostante le innumerevoli complicazioni e difficoltà in fase di produzione, la silice è il materiale più utilizzato e studiato come adsorbente per HPLC e ciò, soprattutto, grazie alla straordinaria reattività chimica della sua superficie.

### **SILICE MODIFICATA CHIMICAMENTE**

La reattività conferita dai gruppi Si-OH superficiali rappresenta insieme un limite e un vantaggio. Da un lato i gruppi silanolici, sia in fase diretta che in fase inversa, interagiscono con analiti nei quali sono presenti gruppi basici e/o polari per dare fenomeni di scodamento dei picchi o decomposizione degli analiti. Dall'altro permettono di modificare la superficie ottenuta tramite il legame di diversi gruppi funzionali.

I gruppi funzionali possono essere diversi a seconda del meccanismo di interazione più idoneo per separare gli analiti (Reversed Phase o RP, Scambio Ionico debole o forte, Affinity, ecc.).<sup>5</sup>

La tecnica separativa più utilizzata è rappresentata comunque dalla Reversed Phase.

Le reazioni che producono i legami più stabili per ottenere silici in fase inversa prevedono l'impiego di un dimetil-alchil-clorosilano o di un dialchil-diclorosilano. Nel primo caso si ottengono modificazioni di tipo monomero, nel secondo caso polimerico.

Nel primo caso si ottengono fasi legate del tipo 'brush', nel secondo strati polimerici di spessore variabile simili a olii siliconici tipici delle fasi liquide gascromatografiche.

Benché questi reagenti siano altamente reattivi, è possibile ricoprire solo il 60% circa della superficie. Ciò significa che buona parte dei gruppi Si-OH risultano ancora presenti e attivi dopo la reazione con la fase legante.

Il gruppo Si-OH è molto polare e ha un comportamento acido; a  $\text{pH} > 3$  dà luogo ad interazioni tipo scambio ionico con analiti contenenti gruppi carichi positivamente. Queste interazioni secondarie sono di tipo specifico e a differenza delle interazioni non-specifiche della fase stazionaria, sono il più possibile da evitare in quanto non riproducibili o causa di adsorbimenti irreversibili.

Occorre quindi neutralizzare i gruppi Si-OH residui, i quali, dopo la reazione con il reattivo legante, risultano stericamente poco accessibili, soprattutto quando la catena idrofobica legata è di grandi dimensioni (C18, Fenile). La neutralizzazione è comunemente eseguita con molecole di piccole dimensioni capaci di raggiungere i gruppi Si-OH, come ad esempio trimetil-clorosilano (end-capping) per formare gruppi Si-O-Si(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>. Anche dopo questo trattamento rimangono gruppi silanologici residui che, nel corso dell'utilizzo, possono dare interazioni non desiderate.

Per quanto riguarda gli impaccamenti, nelle colonne con fasi stazionarie legate con legami covalenti, dopo un certo periodo di utilizzo, è richiesto un *recoating*, cioè un nuovo rivestimento di fase stazionaria, poiché questa si dissolve lentamente nella fase mobile durante il suo passaggio.<sup>6</sup>

## **SCelta DELLA FASE MOBILE E DELLA FASE STAZIONARIA**

Il successo di una cromatografia di ripartizione richiede un adeguato bilancio fra le forze intermolecolari dei partecipanti al processo di separazione: l'analita, la fase mobile e la fase stazionaria. Queste forze intermolecolari sono descritte qualitativamente in termini di polarità relativa fra ognuno dei tre componenti. In generale, le polarità dei comuni gruppi funzionali aumentano in questo senso: olefine < alogeno derivati < solfuri < eteri < nitro-composti < esteri  $\cong$  aldeidi  $\cong$  chetoni < alcoli  $\cong$  ammine < solfuri < solfossidi < ammidi < acidi carbossilici < acqua.

Come regola generale la maggior parte delle separazioni cromatografiche sono eseguite facendo coincidere la polarità dell'analita con quella della fase stazionaria; sono poi usati, come eluenti, solventi a polarità differenti. Questa procedura è generalmente quella che dà maggiori possibilità di successo rispetto a quella in cui sono simili le polarità dell'analita e della fase mobile ma esse sono differenti dalla polarità della fase stazionaria. In questo caso infatti la fase stazionaria non può competere con successo con la fase mobile, i tempi di ritenzione si accorciano quindi drasticamente e si ha spesso sovrapposizione dei picchi cromatografici.