

Cromatografia di soppressione ionica

Se un elettrolita è sufficientemente debole da potersi considerare del **tutto indissociato** a pH non troppo bassi (2-3) o elevati (8-9), non sempre è necessario ricorrere alla IEC per effettuare delle separazioni!

A questi valori di pH la **ionicità** dell'acido HA è stata **soppressa** e perciò diventa possibile separarlo con una semplice cromatografia a fase inversa, usando una fase stazionaria di tipo legato (BPC-RP), che consente elevate prestazioni e grande stabilità.

Cromatografia di coppia ionica

La **cromatografia di coppia ionica** (*Ion Pair Chromatography, IPC*) si basa sul principio di trasformare le specie ioniche, sia forti che deboli, accoppiandole con un opportuno **controione** che neutralizzi la loro carica elettrica, formando un complesso non polare:



La cromatografia viene quindi condotta, al solito, in un sistema a fasi inverse, per esempio usando una **fase stazionaria non polare legata** e un solvente acquoso contenente il controione a concentrazioni che variano fra 0,003 e 0,005 M. Anche in questo caso, dunque, si realizza una BPC-RP.

CROMATOGRAFIA SU FASI CHIRALI

La risoluzione di miscele racemiche (cioè di coppie di enantiomeri) può essere ottenuta, in linea di principio, in due modi.

Metodo pre-colonna (o *off-line*),

Prevede la formazione preliminare di diastereoisomeri

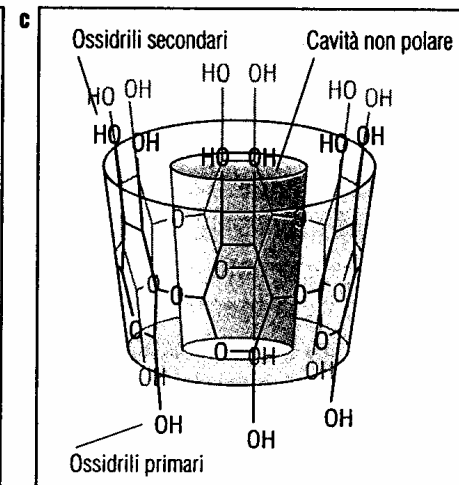
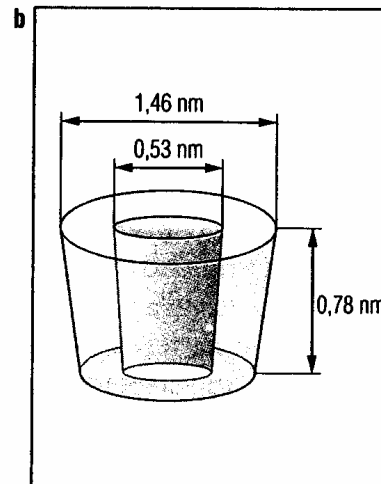
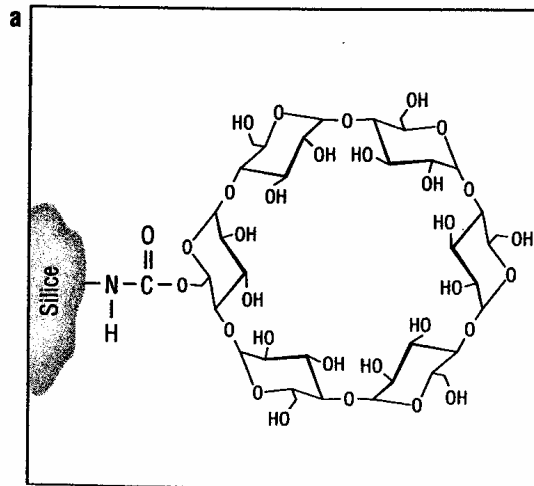
Metodo in-colonna (o *on-line*),

Prevede la formazione di diastereoisomeri mediante l'interazione dinamica reversibile delle specie da separare con uno specifico «mezzo chirale», rappresentato in genere dalla fase stazionaria di un sistema cromatografico.

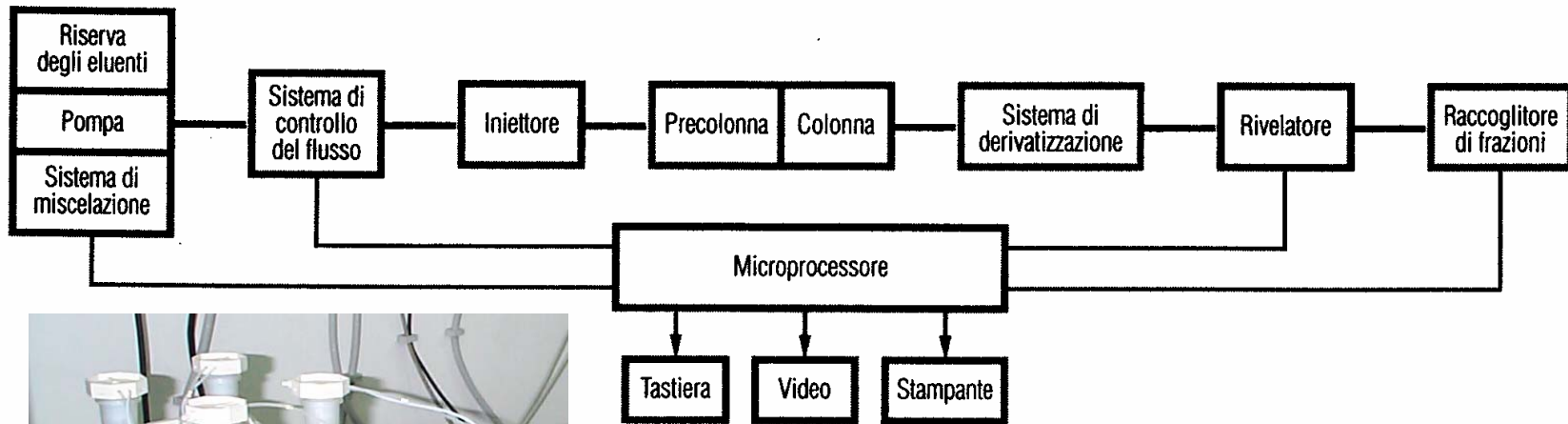
Questo approccio è quello più adottato oggi, sia in GC sia, soprattutto, in HPLC, dove le applicazioni sono ancora più interessanti!

Le fasi stazionarie usate in **cromatografia su fase chirale** (*Chiral Phase Chromatography, CPC-HPLC*) sono sostanzialmente di due tipi:

1. Fasi al cui supporto sono legate piccole molecole che fungono da siti chirali,
2. Fasi che presentano cavità chirali selettive,



IL GROMATOGRAFO PER HPLC



RISERVA DELLA FASE MOBILE

I contenitori devono essere di **materiale inerte** per non inquinare il solvente e devono avere una capacità da assicurare l'esecuzione di un certo numero di analisi

I materiali usati sono solitamente il **vetro**, l'**acciaio inox** o il **politetrafluoroetilene**.



FILTRI

Si usano filtri con diametro dei pori di 5-10 μm , che non provocano significative cadute di pressione e allo stesso tempo bloccano le particelle indesiderate.

POMPE

I requisiti fondamentali di una pompa, o di un sistema di pompe, per HPLC sono:

- fornire elevate pressioni d'ingresso (fino a 400 atm);
- mantenere un flusso di eluente il più costante e riproducibile possibile;
- consentire un'ampia gamma di flussi (da almeno 0,5 a 10 mL/min);
- avere un volume morto molto piccolo, per minimizzare le possibili variazioni di composizione dell'eluente quando si lavora in gradiente;
- avere un adeguato sistema di smorzamento delle pulsazioni;
- avere una notevole inerzia chimica;
- avere un'elevata autonomia;
- consentire rapide operazioni di ricambio della fase mobile e di pulizia;
- essere poco rumorosa, poco ingombrante, priva di vibrazioni eccessive e garantire sicurezza nel caso in cui si usino solventi infiammabili o volatili.

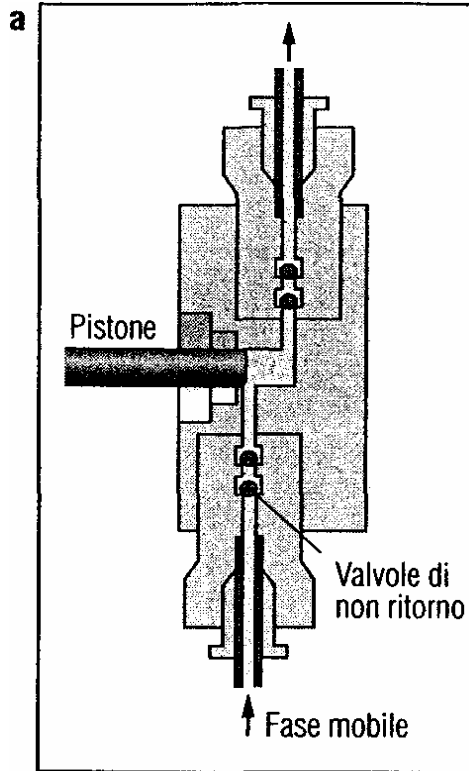
Il requisito più importante, in ogni caso, è che sia in grado di fornire un flusso costante e riproducibile.

Le pompe a flusso costante usate in HPLC sono di due tipi:

Le **pompe pneumatiche**, ormai cadute in disuso, sono costituite da una riserva di gas compresso che viene lasciato espandere contro un pistone in modo costante.

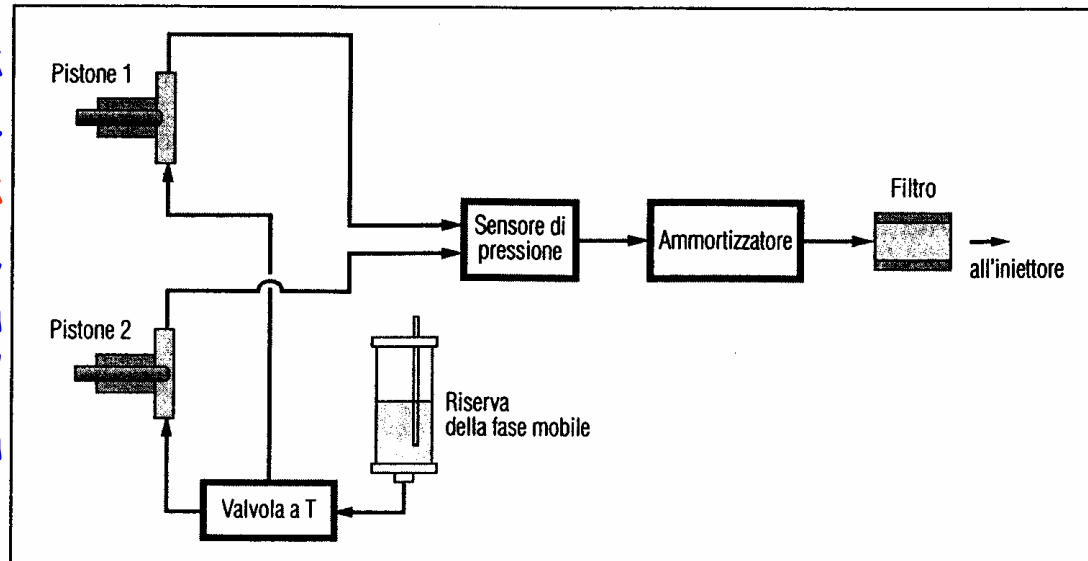
Queste pompe non consentono di usare più di una fase mobile alla volta

Le **pompe meccaniche**, sono costituite da un pistone di piccole dimensioni, collegato al movimento di una vite senza fine. Questo dispositivo consente di evitare l'uso di un gas compresso, ma presenta gli stessi pregi e difetti delle pompe pneumatiche.



Con queste pompe, però, non si può ottenere una pressione costante, perché, a causa delle pulsazioni, si verifica una caduta di pressione ogni volta che il pistone ritorna nella posizione di partenza

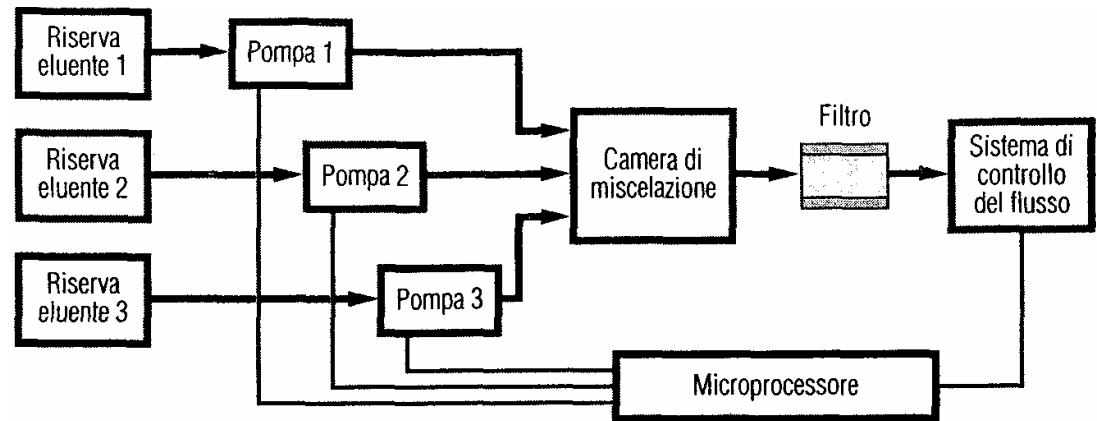
Quest'ultimo problema è stato risolto con le **pompe reciprocanti a due pistoni**, che sono, in ogni istante, l'uno in fase di scarica dell'eluente e l'altro in fase di ricarica.



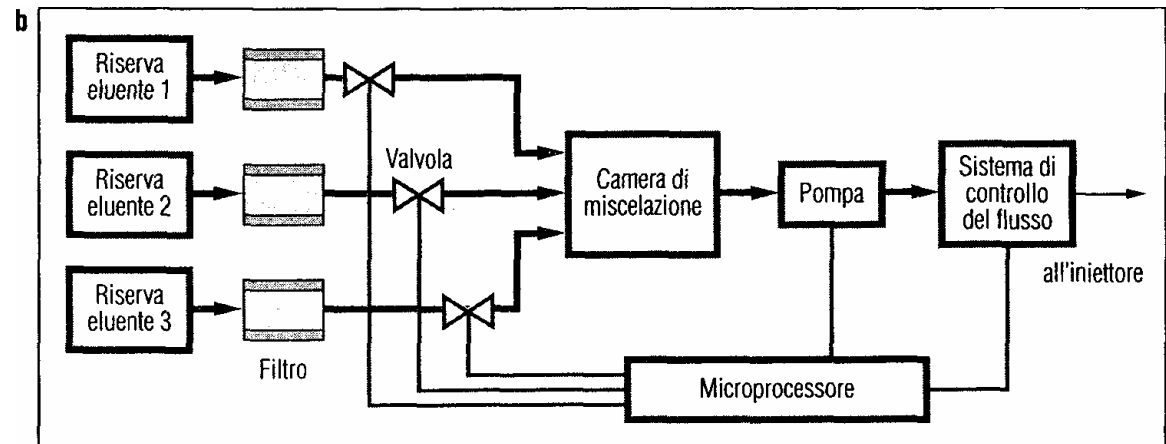
SISTEMI PER REALIZZARE IL GRADIENTE DI ELUIZIONE

La miscelazione dinamica dei solventi può essere realizzata in due modi diversi:

1. ad alta pressione



2. a bassa pressione

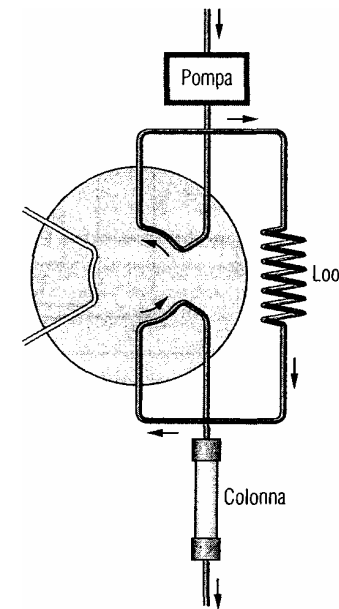
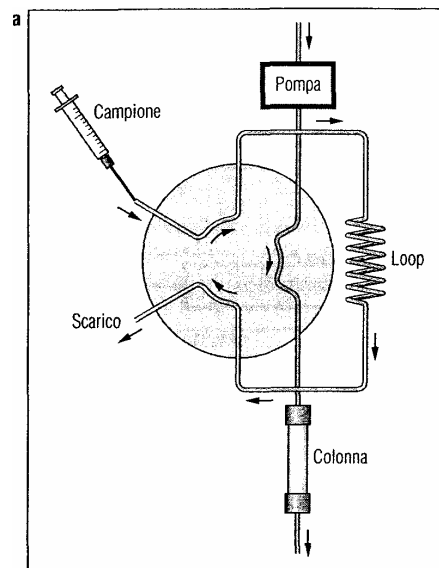


SISTEMI DI INIEZIONE

Il campione può essere introdotto con una **siringa** o mediante una apposita **valvola**, che viene azionata manualmente o meccanicamente.

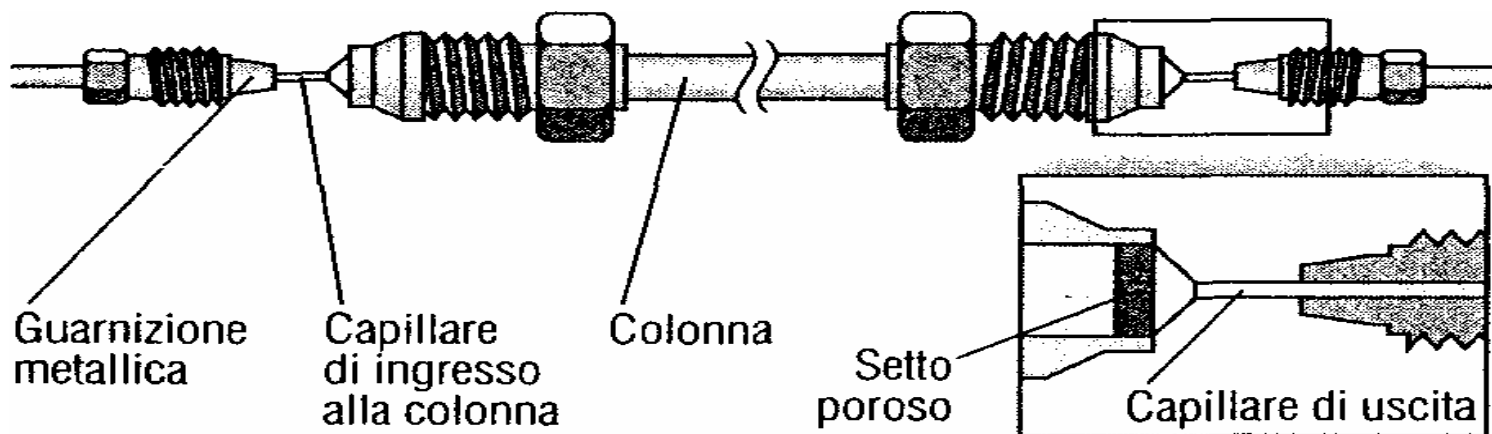
Nel caso si usi una microsiringa, dopo aver interrotto il flusso, il campione viene iniettato attraverso un setto di Teflon nella camera di iniezione posta in testa alla colonna.

Con il sistema a valvola il campione viene introdotto appena a monte della colonna e trascinato in quest'ultima dalla fase mobile senza interrompere il flusso.



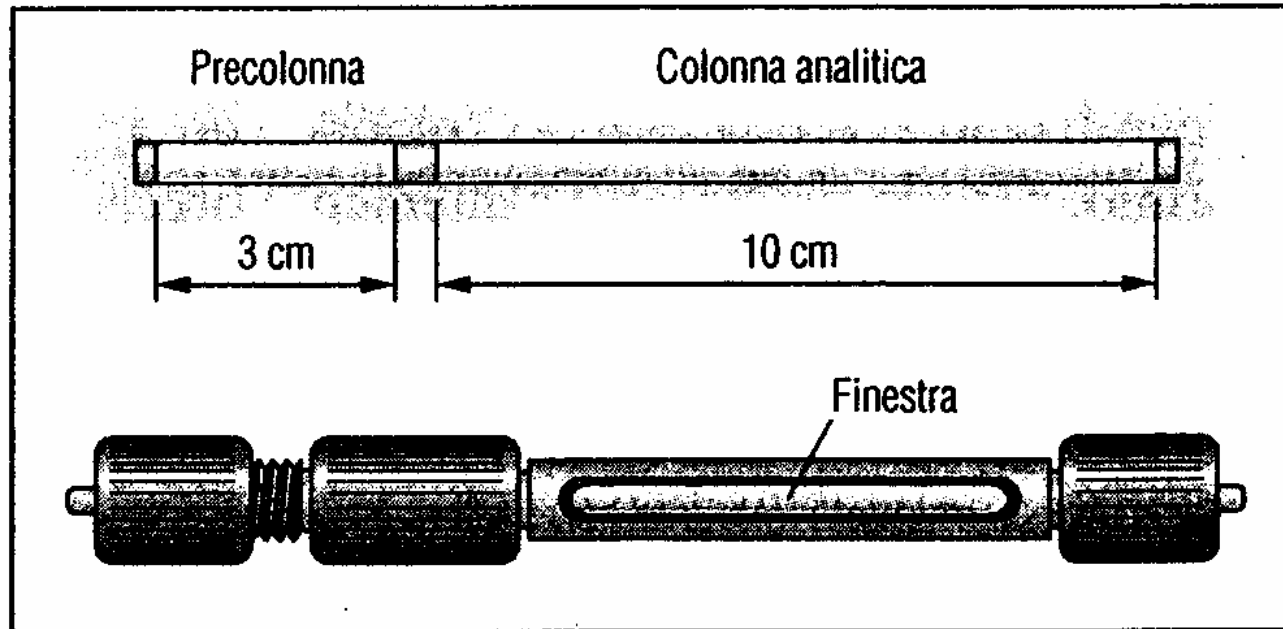
COLONNE

La colonna, insieme con la pompa, è l'elemento fondamentale del cromatografo.



Struttura di una colonna per HPLC e particolare ingrandito dell'uscita della colonna. Le guarnizioni metalliche a cono assicurano una perfetta tenuta dei bulloni. Il capillare di ingresso della colonna ha un diametro di 0,5 mm; il piccolissimo volume interno evita l'allargamento dei picchi. La colonna cromatografica ha un diametro interno costante, pareti accuratamente levigate e termina in modo perfettamente piatto per assicurare una buona tenuta e rendere praticamente nullo il volume morto. Lo spazio conico dopo il setto poroso assicura una distribuzione ottimale della fase mobile e del campione su tutta la superficie della colonna. Il volume ridottissimo del capillare di uscita minimizza la diffusione dei composti eluiti evitando l'allargamento dei picchi del cromatogramma.

Spesso per proteggere la colonna da sostanze inquinanti che possono essere adsorbite in modo irreversibile dal supporto, si pone una **precolonna** riempita dello stesso materiale ma di granulometria più grande o in forma bellicolare.

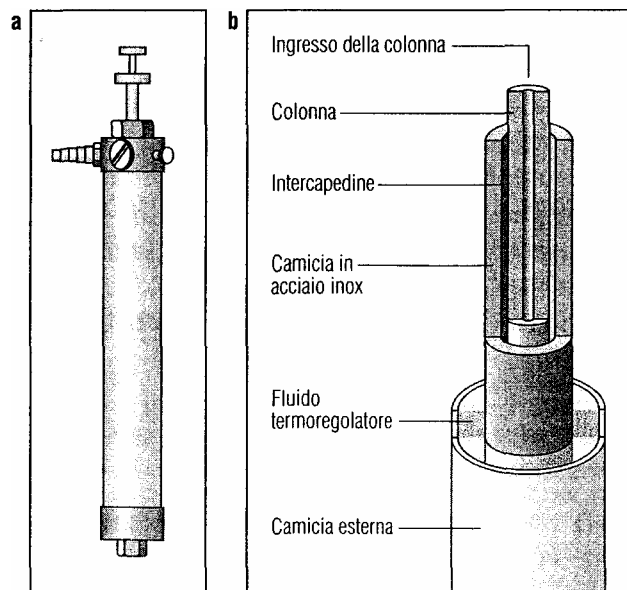


Infine, l'efficienza di una colonna dipende anche dalla forma dei terminali e dalle dimensioni dei tubi di collegamento in acciaio inox. Questi ultimi devono essere i più corti possibile e di diametro non inferiore a 0,25 mm, per evitare l'«**effetto terminale**».

TERMOSTATO

In HPLC le variazioni di temperatura devono mantenersi ben al di sotto dell'1% per assicurare la riproducibilità delle analisi.

La termostatazione viene effettuata sia mediante la **circolazione forzata di aria** (e in questo caso la colonna viene racchiusa in un'apposita camera), sia con **bagno d'acqua** usando colonne con apposita camicia



La programmazione della temperatura viene usata molto raramente perché (diversamente dalla GC) questo parametro incide in modo poco significativo sulle prestazioni.

RACCOGLITORE DI FRAZIONI

E' conveniente raccogliere le diverse frazioni manualmente, via via che le bande vengono segnalate dal registratore.

I sistemi di raccolta automatici si usano soprattutto quando si effettuano separazioni preparative.

I raccoglitori automatici possono funzionare a tempo, raccogliendo frazioni di uguale volume a intervalli di tempo prefissati, oppure possono raccogliere le frazioni fra l'inizio e la fine della comparsa di un picco.

MISURATORI DI FLUSSO

In HPLC, il controllo del flusso ha la stessa importanza che il controllo della temperatura ha in GC.

Esistono diversi metodi per misurare il flusso

Sistema a bolle

Sistemi volumetrici

Flussimetro

Sistema gravimetrico