

# FASE MOBILE

## Requisiti generali:

- **Bassa viscosità:** minore è la viscosità, maggiore è l'efficienza della colonna e inoltre i tempi di analisi sono più brevi e la pressione di ingresso necessaria è più bassa.
- **Immiscibilità** con la fase stazionaria: ciò è valido soprattutto in LLC e sempre quando si usano polimeri come fase stazionaria.
- **Capacità di solubilizzare il campione:** il solvente deve sciogliere completamente il campione senza diventare torbido.
- **Compatibilità con il rivelatore:** un solvente usato con un rivelatore UV/visibile, per esempio, deve essere trasparente alla lunghezza d'onda analitica; se invece si usa un rifrattometro, il solvente deve avere un indice di rifrazione costante; e così via.
- **Bassa corrosività.**
- **Bassa volatilità.**
- **Minima tossicità.**
- **Basso costo e facile reperibilità.**
- **Elevata purezza:** ciò consente di rendere minimo l'inquinamento della colonna e di ottenere cromatogrammi privi di interferenze (H<sub>2</sub>O x HPLC).

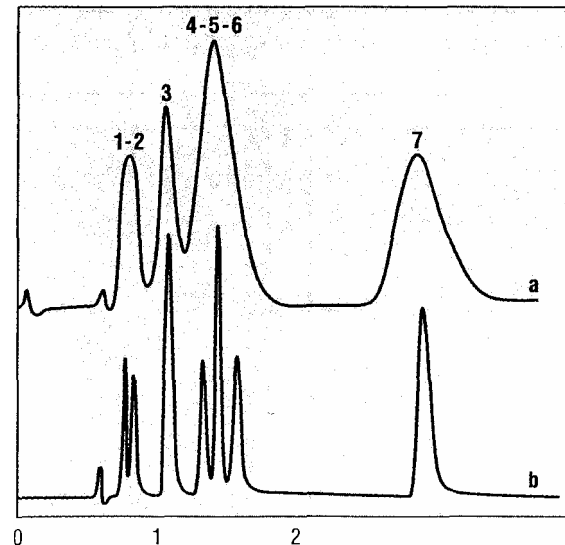
# CROMATOGRAFIA LIQUIDO-SOLIDO

La **cromatografia liquido-solido**, (*Liquid-Solid Chromatography, LSC*) utilizza **fasi stazionarie granulari** a varia porosità, generalmente **polari**, che vengono accoppiate a **fasi mobili non polari**: per questo viene anche detta «**cromatografia a fase normale**».

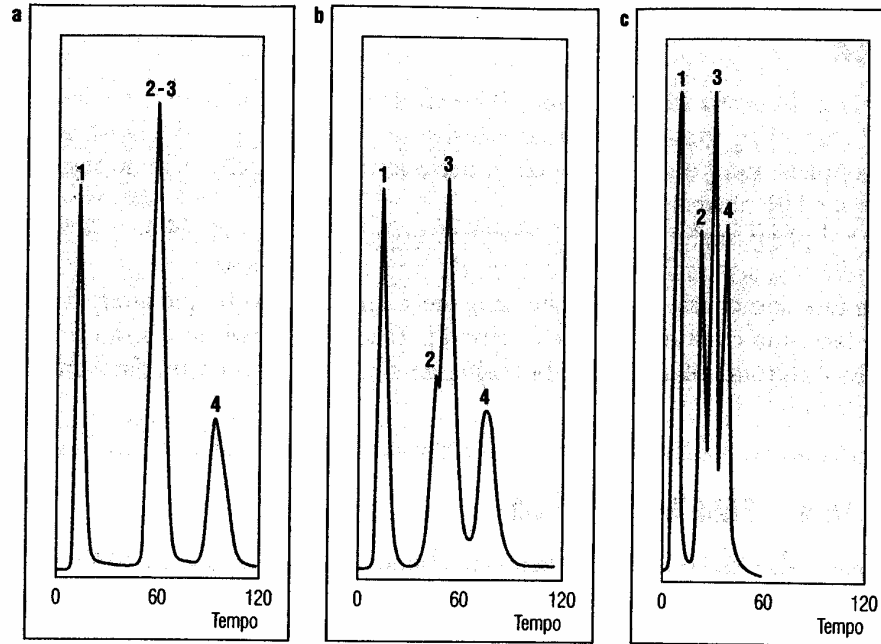
## FASE STAZIONARIA

**Gel di silice**. E' il materiale più usato, in quanto consente di ottenere particelle porose, resistenti meccanicamente e più o meno uniformi secondo le esigenze.

La figura illustra l'effetto della granulometria (a: 30  $\mu\text{m}$ , b: 5  $\mu\text{m}$ ) sulla risoluzione quando la velocità lineare dell'eluente è elevata.



Un'altra caratteristica di questi materiali, spesso erroneamente trascurata, riguarda la diversa struttura dei pori: a parità di granulometria media, infatti, la superficie specifica, il diametro e il volume dei pori possono influire in modo decisivo sulla qualità della separazione.



Le microparticelle possono essere di due tipi:  
*di forma irregolare*  
*di forma regolare o sferica.*

Le prime offrono una maggiore superficie di scambio, per cui l'efficienza dovrebbe essere favorita, ma comportano maggiori difficoltà nell'impaccare uniformemente le colonne.

Il gel di silice ha proprietà leggermente acide e quindi trattiene preferenzialmente i composti basici. I siti attivi del gel di silice danno interazioni abbastanza forti con le sostanze eluite e ciò può causare fenomeni di *tailing*, o addirittura un vero e proprio adsorbimento chimico

**Gel di silice pellicolare** è costituito da microfibre di vetro con diametro di 37÷43  $\mu$ m, rivestite da un sottile strato uniforme di gel di silice poroso

**Allumina.** Ha caratteristiche leggermente basiche e rappresenta quindi una valida alternativa al gel di silice nei casi in cui non si ottengano separazioni soddisfacenti. E' abbastanza diffusa la forma pellicolare, ottenuta facendo depositare un sottile strato di allumina neutra su fibre di vetro con diametro di 37÷43  $\mu$ m.

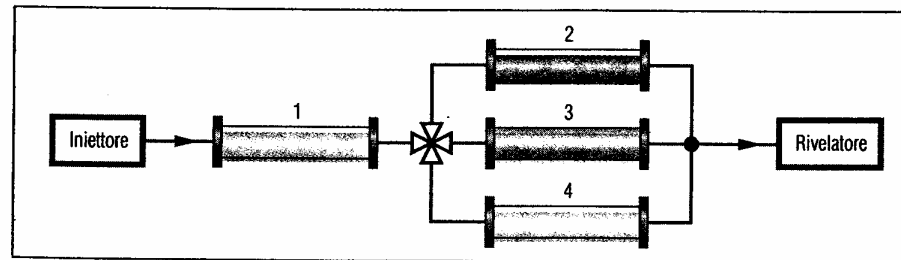
# FASE MOBILE

Le interazioni chimico-fisiche che consentono la separazione dei componenti di una miscela in colonna vengono interpretate nei termini di una competizione fra le molecole del soluto e quelle del solvente (la fase mobile) per occupare i siti di adsorbimento della fase stazionaria, che si trovano sulla sua superficie e all'interno dei micropori.

La **forza eluotropa** dei solventi dipende dalla loro polarità, che può essere espressa in termini di «forza del solvente» rispetto all'allumina.

# CRITERI PER LA SCELTA DELLA COPPIA FASE MOBILE/FASE STAZIONARIA

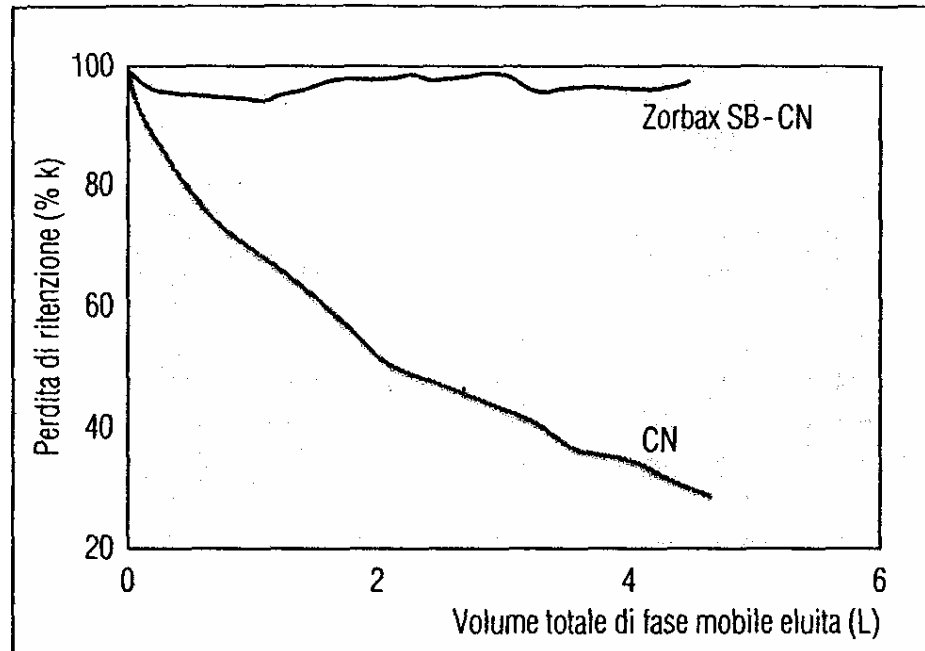
- **Programmare il flusso**, oppure, nel caso di miscele molto complesse, disporre in serie colonne con fasi stazionarie diverse.
- Effettuare una separazione con la **tecnica del «riciclo»**, cioè facendo passare più volte, in modo continuo, l'eluente in uscita attraverso la stessa colonna. L'eluente viene inviato al rivelatore dopo un certo numero di cicli.
- **Accoppiare più colonne**, la prima con una bassa selettività e le altre con un potere di ritenzione via via crescente, collegandole per esempio secondo lo schema di figura 16.9.



Questo tipo di interventi, però, può comportare una sensibile perdita di efficienza dovuta alla inevitabile presenza di volumi morti nelle connessioni!!!

# CROMATOGRAFIA SU FASE LEGATA

Nella **cromatografia su fase legata** (*Bonded Phase Chromatography, BPC*), la fase stazionaria è legata chimicamente al supporto solido, con cui forma un tutt'uno particolarmente stabile.

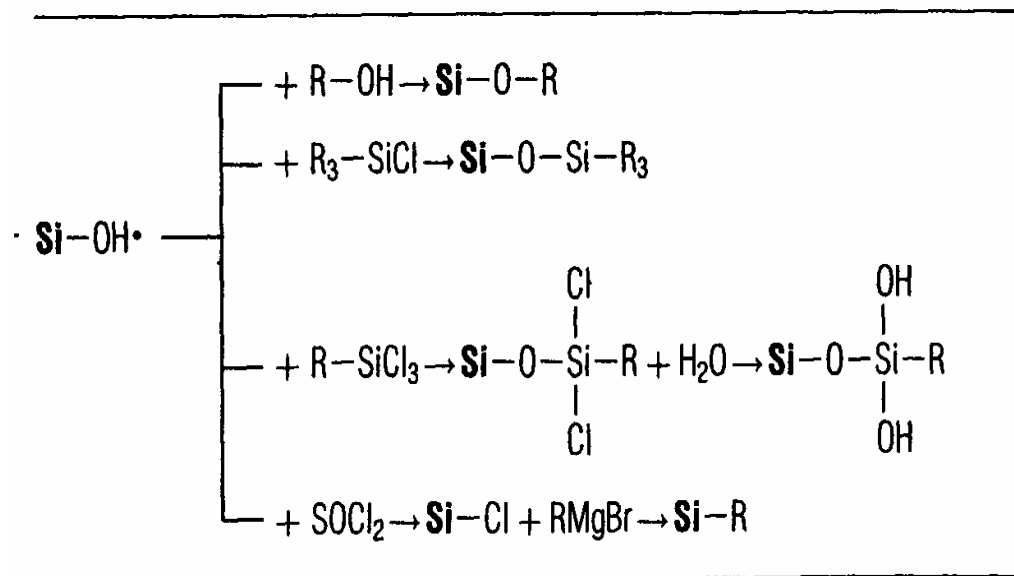


# FASE STAZIONARIA

I supporti a cui vengono chimicamente legate le molecole della fase stazionaria sono di diverso genere:

- microparticelle di gel di silice (3÷10 mm); è il materiale di gran lunga più diffuso, disponibile con varie caratteristiche;
- microparticelle di zirconio ( $ZrO_2$ );
- microparticelle di materiali contenenti legami carbonio-fluoro;
- microparticelle polimeriche a base di PS-DVB (polistirene-divinilbenzene) o di PMA (polimetacrilato);
- microparticelle di gel di silice legate a una fase polimerica;
- microsferi di vetro tal quali o rivestite da un sottile film di gel di silice, adatte per ottenere fasi pellicolari.

## Reazioni di formazione della fase legata:



Fasi legate molto sensibili all'idrolisi, che quindi non possono essere usate in solventi acquosi.

Decisamente più stabili agli agenti idrolitici nelle normali condizioni di utilizzo (pH 2–8).

Sono molto stabili anche a temperature elevate e per questo motivo trovano oggi largo impiego

Per ragioni di tipo sterico, in genere solo il 50% circa degli -OH liberi reagisce effettivamente e viene quindi modificato.

Mediante un ulteriore trattamento (*end capping*, nel linguaggio tecnico) con reagenti costituiti da molecole di piccole dimensioni come il trimetilclorosilano, ( $\text{CH}_3\text{SiCl}$ ), si neutralizzano i gruppi residui in modo quasi completo.

Come in LLC, anche nel caso della cromatografia su fase legata la fase stazionaria può essere:

- di tipo polare, e quindi richiede una fase mobile non polare per realizzare una cromatografia normale su fase legata (*Bonded Phase Chromatography-Normal Phase, BPC-NP*);
- di tipo non polare, e quindi associata a una fase mobile polare per realizzare una cromatografia inversa su fase legata (*Bonded Phase Chromatography-Reversed Phase, BPC-RP*).

# FASE MOBILE

Quando si lavora con **fasi stazionarie legate polari** (per esempio cianoalchile o ossidrile), la **fase mobile** deve essere sostanzialmente **non polare**, in modo che i componenti della miscela vengano eluiti in ordine di polarità crescente.

Nella fase di messa a punto di un metodo di separazione si inizia con una percentuale dell'1% di solvente polare, che viene poi aumentata in modo opportuno.

Se la fase stazionaria è di tipo non polare, si realizza una BPC-RP, in cui l'eluente è perlopiù una miscela binaria di acqua e un solvente idromiscibile meno polare.

Nella fase di messa a punto di un metodo di separazione, di solito si usa la coppia **acqua/acetonitrile** o, in seconda battuta, la coppia **acqua/metanolo**, variandone opportunamente i rapporti nel corso delle prove.

# CROMATOGRAFIA DI ESCLUSIONE

La **cromatografia di esclusione** (*Size Exclusion Chromatography*, SEC) sta incontrando sempre maggiore favore sia in campo analitico che preparativo.

Si parla ancora di:

**GFC** (*Gel Filtration Chromatography*) quando si opera in ambiente acquoso

**GPC** (*Gel Permeation Chromatography*) quando si usa un solvente organico.

Attualmente questa tecnica si applica con risultati soddisfacenti perlopiù quando le masse molari delle sostanze da separare sono maggiori di 1000–2000 uma e differiscono fra loro di almeno il 10%.

L'applicazione della SEC all'HPLC è diventata possibile con la realizzazione di **gel semirigidi e rigidi**, che si mantengono stabili anche a pressioni elevate dell'eluente.

# FASE STAZIONARIA

Per risolvere particolari problemi separativi, molti materiali sono studiati in modo tale da accoppiare all'esclusione i meccanismi di **adsorbimento**, **ripartizione** e **scambio ionico**.

In genere i materiali si possono suddividere in due categorie: *gel semirigidi* e *gel rigidi*.

**Gel semirigidi.** Sono costituiti da polimeri o copolimeri

Questi gel vengono perlopiù **usati con solventi poco polari** come benzene, toluene, solventi clorurati, acetonitrile, tetraidrofurano

Vanno invece **evitati solventi decisamente apolari** (come *n-esano*) o molto polari (alcoli).

**Gel rigidi.** Sono costituiti da silice o fibre di vetro microporose

Un problema non trascurabile che si riscontra nell'uso di questi materiali è rappresentato dalla presenza di gruppi -OH liberi sulla superficie delle particelle sia di vetro che di silice.

# FASE MOBILE

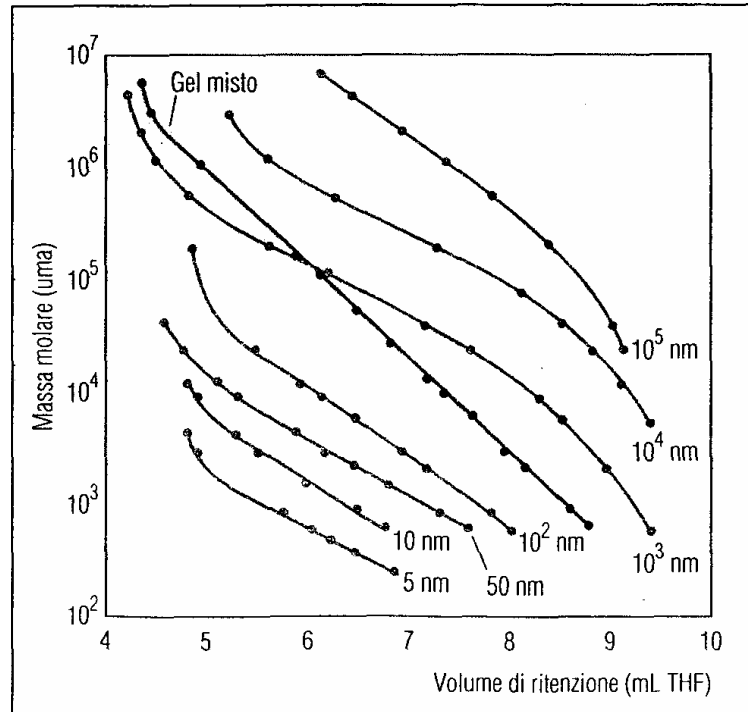
Il solvente deve avere i seguenti requisiti:

- deve sciogliere completamente il campione,
- non deve interagire con quest'ultimo e neppure con il gel della fase stazionaria,
- non deve causare fenomeni di ripartizione
- deve essere compatibile con il rivelatore.

Le soluzioni acquose devono avere, quando occorre, valori di pH tali da mantenere nella forma indissociata le molecole da separare.

# CRITERI PER LA SCELTA DELLA FASE STAZIONARIA

La scelta del tipo di gel va effettuata in funzione dell'intervallo di separazione. Quando le molecole hanno masse molari molto simili è necessario ottenere la massima risoluzione e ciò si realizza con gel la cui curva di calibrazione abbia la minima inclinazione possibile. In questo caso, infatti, molecole di massa molare simile avranno volumi di ritenzione sufficientemente diversi fra loro.

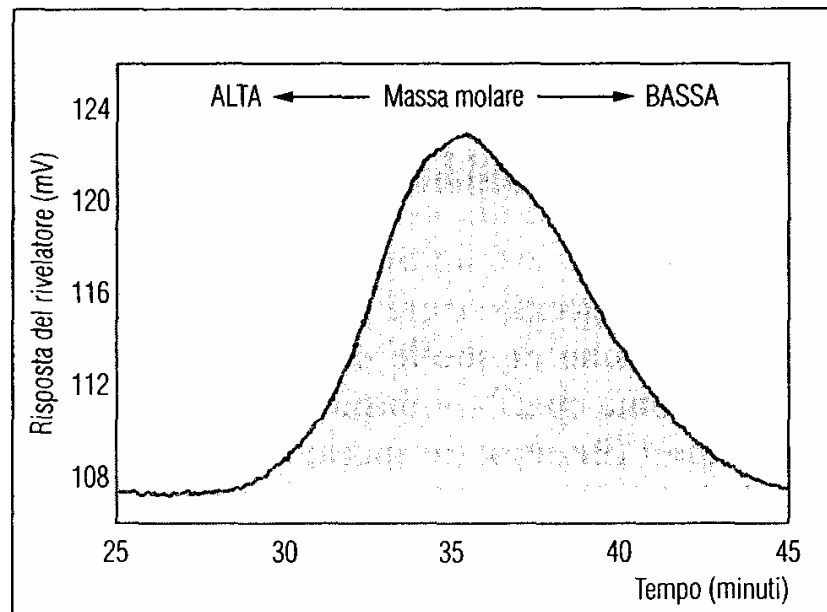


# APPLICAZIONI

Il campo di applicazione della SEC va dalla separazione di composti organici semplici ai polimeri.

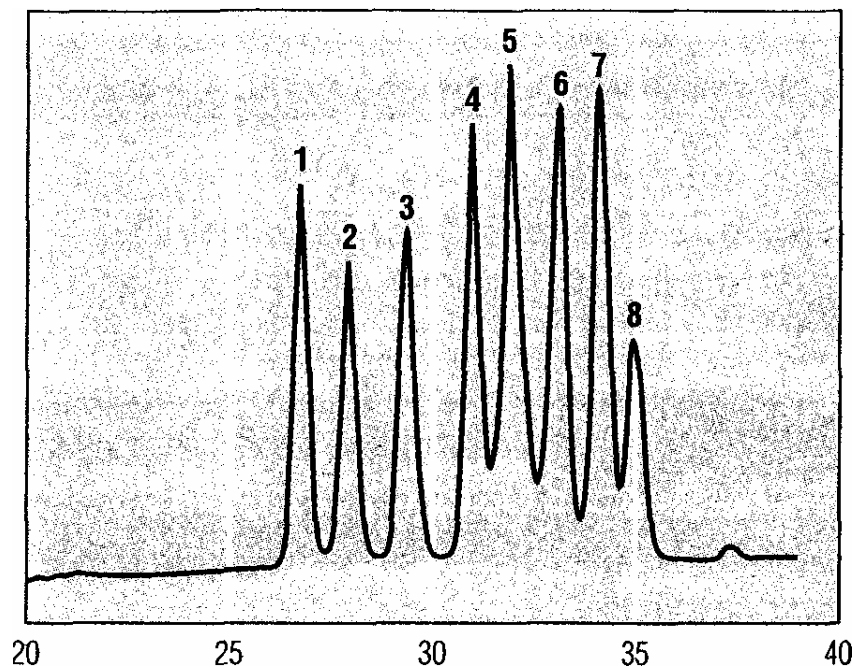
Una applicazione di una certa importanza riguarda il **controllo di qualità dei polimeri**

Infatti parametri come la resistenza, la flessibilità, la rigidità o la fragilità dipendono proprio dalla distribuzione delle lunghezze delle catene che compongono il polimero.



Un'altra interessante applicazione della HPLC-SEC riguarda le specie di piccole dimensioni, ovvero di piccola massa molare.

In effetti, le fasi stazionarie messe a punto più recentemente consentono di ottenere separazioni accettabili fino a molecole piuttosto piccole, come quelle del benzene e dei suoi derivati più semplici



- (1) n-decilbenzene [MM=218,4];
- (2) (2) n-ottilbenzene[190,3];
- (3) (3) n-esilbenzene [162,3];
- (4) n-butilbenzene [134,2];
- (5) n-propilbenzene [120,2];
- (6) etilbenzene [106,2];
- (7) toluene[92,1];
- (8) benzene

Da la possibilità di assumere la massa molare come sola discriminante fra le varie specie chimiche (indipendentemente, p.es., dalla loro polarità)

# CROMATOGRAFIA DI SCAMBIO IONICO

Per separare specie ioniche, si devono usare fasi stazionarie in grado di scambiare ioni con l'eluente, cioè degli *scambiatori ionici*. La tecnica che ne deriva è detta **cromatografia di scambio ionico a elevate prestazioni** (*High Performance Ion Exchange Chromatography, HPIEC*)

Ovviamente la presenza di gruppi attivi in grado di scambiare cationi o anioni non esclude che, oltre allo scambio ionico (che resta perlopiù il meccanismo fondamentale), possano intervenire nel corso della separazione **altri meccanismi**, come l'adsorbimento o la ripartizione.

Le applicazioni della HPIEC possono essere suddivise in :

1. separazione di molecole organiche elettricamente cariche;
2. separazione di ioni inorganici.

I fattori principali da cui dipendono il tempo di ritenzione, e in generale le prestazioni di una colonna, sono i seguenti:

- natura chimica, porosità, granulometria e capacità della fase stazionaria e dell'eventuale supporto;
- carica e dimensioni degli ioni;
- pH dell'eluente;
- forza ionica dell'eluente;
- presenza di *modificatori organici* (ovvero particolari solventi) nell'eluente;
- temperatura.

# FASE STAZIONARIA

- **scambiatori cationici forti** (*Strong Cation Exchangers, SCX*), che contengono il gruppo solfonico,  $\text{SO}_3^-$  (e sono usati soprattutto per l'analisi di cationi metallici);
- **scambiatori cationici deboli** (*Weak Cation Exchangers, WCX*), il cui gruppo attivo è lo ione carbossilato,  $\text{COO}^-$ , o fenato,  $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}^-$ , sono usati per separare proteine e polipeptidi (il campo di pH operativo è compreso fra 3 e 13);
- **scambiatori anionici forti** (*Strong Anion Exchangers, SAX*), caratterizzati da un gruppo ammonico quaternario (il campo di pH operativo è compreso fra 1 e 13); sono usati soprattutto per l'analisi di proteine;
- **scambiatori anionici deboli** (*Weak Anion Exchangers, WAX*), che contengono gruppi amminici terziari o secondari o polietileniminici (PEI), legati covalentemente ai gruppi ossidrilici che affiorano sulla superficie del supporto (il campo di pH operativo è compreso fra 2 e 12)

Tutti gli scambiatori sono supportati su materiale di diverso tipo (silice, polimeri, etc)

# FASE MOBILE

La scelta dell'eluente dipende, anzitutto, dal tipo di sostanze che si devono separare: sostanze organiche (ioniche o ionizzabili) oppure specie inorganiche.

In tutti i casi, le variabili da prendere in considerazione sono:

- il pH;
- la forza ionica;
- l'eventuale *modificatore organico*.

**pH.** In generale, ma soprattutto se si lavora in presenza di elettroliti deboli o di specie anfotere (quindi in campo prevalentemente organico), il pH dell'eluente è decisivo per la riuscita della separazione.

Nel caso di campioni particolarmente complessi, si può effettuare una eluizione **in gradiente di pH**

E questo il principio fondamentale su cui si basano gli **Aminoacid Analyser**

**Forza ionica.** Oltre al pH, anche la concentrazione dei sistemi tampone usati per l'eluizione e l'eventuale aggiunta di sali neutri (come  $\text{NaNO}_3$ ) può agire in modo determinante sulla selettività della resina, riducendo i tempi di ritenzione o anche mantenendo le bande più compatte.

Quando le specie da separare sono **elettroliti forti**, si devono usare tamponi che comportano una **forza ionica elevata**, mentre in presenza di **elettroliti deboli** (come le vitamine o gli acidi nucleici) si devono usare tamponi di **minore forza ionica**.

Quando un campione si presenta particolarmente complesso, si può fare ricorso alla eluizione **in gradiente di forza ionica**

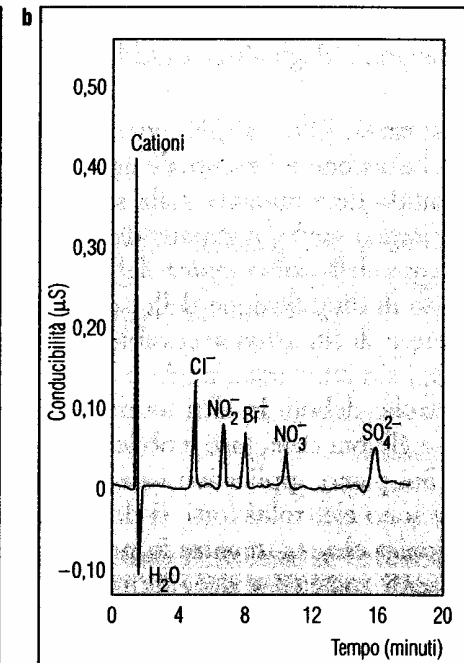
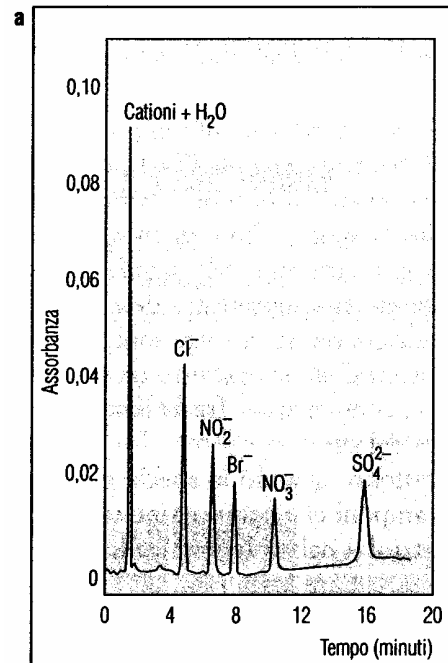
**Modificatori organici:** acetonitrile o metanolo.

# RIVELAZIONE DEGLI IONI ALL'USCITA DELLA COLONNA

a. I composti eluiti assorbono in modo significativo nell'UV/visibile.

b. I composti eluiti hanno una conducibilità elettrica significativamente diversa dall'eluente.

c. I composti eluiti non assorbono nell'UV/visibile o non hanno una conducibilità elettrica significativamente diversa dall'eluente, oppure sono presenti in tracce non facilmente rivelabili.



Le alternative per aggirare questi problemi di rivelazione sono più di una e sono oggetto di continui approfondimenti e in generale si riassumono nelle seguenti possibilità:

- ottimizzare i sistemi di **preconcentrazione** per aumentare la sensibilità del metodo;
- sviluppare adeguati sistemi di **derivatizzazione** pre o postcolonna oppure sistemi di estrazione postcolonna;
- usare **altri** tipi di **rivelatori**, come lo spettrofotometro di assorbimento atomico, lo spettrometro a emissione ICP, il voltmetro, l'amperometro o il coulombometro;
- usare **rivelatori conduttimetrici** associati a sistemi che consentano di «sopprimere», per mezzo di opportune reazioni chimiche, la conducibilità dell'eluente e, contemporaneamente, di far crescere la conducibilità degli ioni eluiti.

# CROMATOGRAFIA IONICA CON SISTEMI DI SOPPRESSIONE (IC)

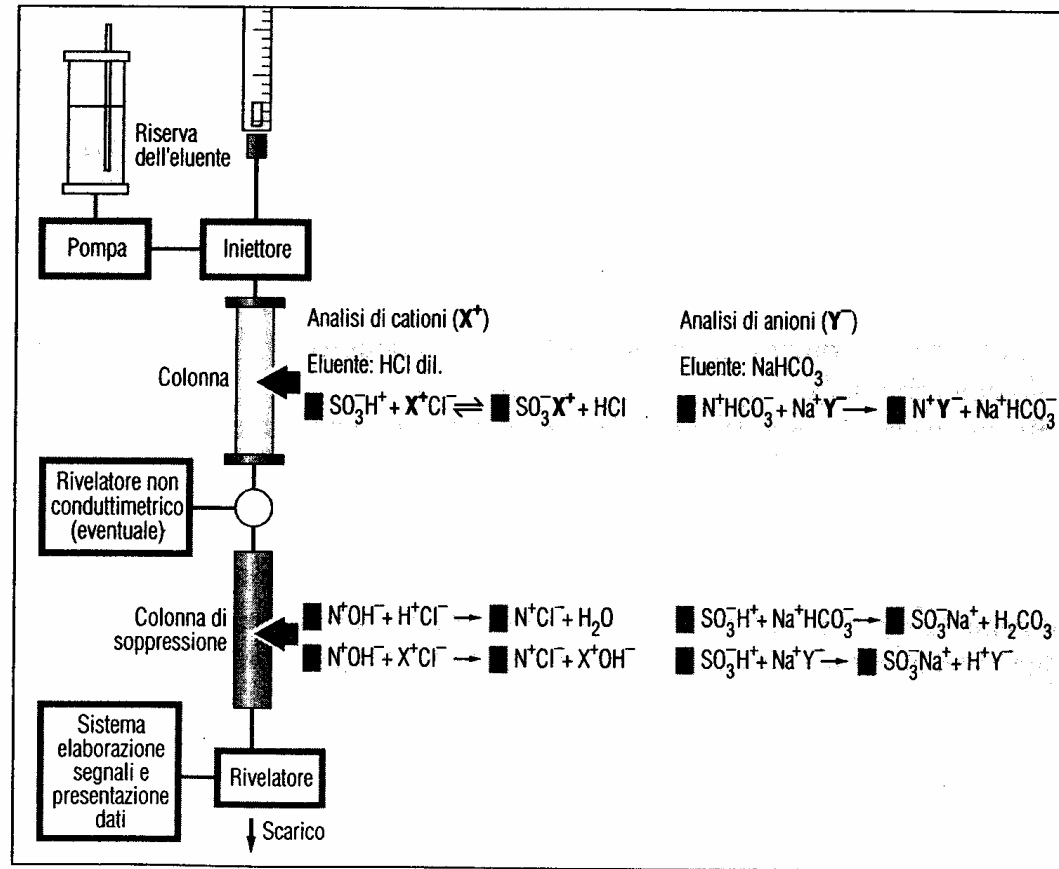
Si basa su un sistema a due colonne, entrambe a scambio ionico

La prima, infatti, ha una bassa capacità (in modo da consentire l'uso di soluzioni tampone molto diluite) e serve per separare le specie contenute nel campione.

L'eluente in uscita da questa colonna viene poi fatto passare in una seconda colonna di «soppressione chimica», riempita con resine porose a scambio ionico e di elevata capacità

Questa colonna ha la funzione di abbattere drasticamente la conducibilità dovuta agli ioni del tampone, esaltando così quella dovuta agli ioni da rivelare.

Schema generale di una apparecchiatura IC a elevate prestazioni:  
 (a sinistra) analisi di cationi;  
 (a destra) analisi di anioni.



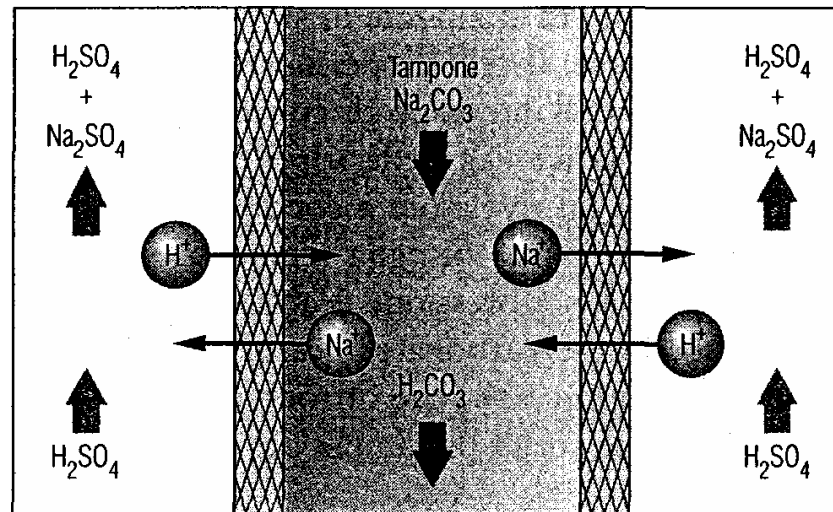
In definitiva, all'uscita dal sistema di soppressione la conducibilità della fase mobile viene notevolmente abbattuta, mentre viene esaltata la conducibilità degli ioni sottoposti ad analisi in seguito all'accoppiamento con un controione particolarmente mobile.

# Resine per IC di soppressione

All'inizio, le colonne di soppressione erano costituite da resine a scambio ionico sotto forma di particelle microporose di capacità relativamente alta (3-5 meq/mL) che andavano rigenerate ogni 8 ore.

Oggi il problema è stato superato sfruttando i seguenti sistemi:

**Soppressori a fibra (FS):** costituiti da resine polietilensolfonato, che hanno la proprietà di autorigenerarsi.



La capacità di queste resine è piuttosto bassa. Gli eluenti in genere sono soluzioni tampone molto diluite.

b. Con l'introduzione (1985) di **soppressori a micromembrana** (MMS), che hanno il potere autorigenerante delle fibre, ma hanno una **capacità relativamente più elevata** (da 10 a 15 volte) e consentono anche di effettuare analisi in gradiente, utilizzando peraltro una gamma più ampia di eluenti.

c. Con la recente introduzione (1993) di **soppressori autorigeneranti** (SRS), che per via elettrolitica neutralizzano gli eluenti acidi o basici e producono gli ioni a bassa conducibilità necessari nell'analisi.