

CRITERI PER LA SCELTA DELLA FS E DELLA FM

Criteriono fondamentale è che le due fasi abbiano polarità diversa e una discreta affinità per la miscela da separare.

- La **cromatografia di ripartizione** offre **migliori prestazioni** rispetto alla **cromatografia di adsorbimento**
- L'uso **dell'acqua come liquido di ripartizione** consente un'ampia scelta per l'eluente (o per la sequenza di eluenti) più adatto e consente così di lavorare con una fase mobile di polarità ottimale.
- La miscela deve essere **molto solubile nella fase mobile scelta**
- Le diverse classi di composti organici sono trattenute da una fase stazionaria polare (quindi molto attiva) come l'allumina nel seguente ordine di **forza decrescente**: **acidi e basi** • **alcoli e tioli** • **aldeidi e chetoni** • **esteri e alogenuri** • **areni** • **alcheni e alchini** • **alcani**
- Per una fase stazionaria non polare come il carbone attivo, invece, l'ordine è inverso.
- In genere con la **cromatografia di adsorbimento** si effettua una separazione per **classi di composti**, mentre con la **cromatografia di ripartizione** si effettua anche una **separazione dei composti in una determinata classe** (o serie omologa).
- Per accelerare l'eluizione di una specie chimica trattenuta piuttosto tenacemente dalla fase stazionaria, si deve migliorare la sua affinità con la fase mobile.

PRESTAZIONI

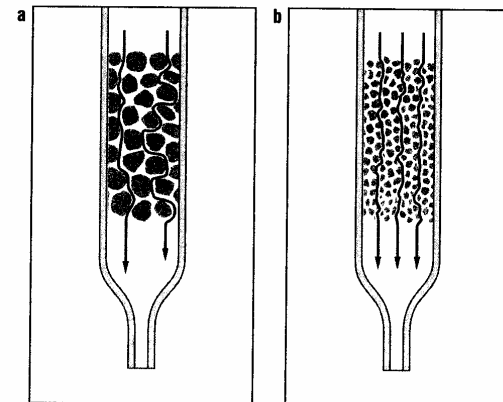
Le prestazioni di una separazione su colonna si misurano in base alle caratteristiche di: **selettività, efficienza, risoluzione, capacità e riproducibilità.**

La **selettività**, ossia la capacità di fornire bande ben distanziate, dipende essenzialmente dalla coppia fase mobile/fase stazionaria, oltre che dalla **temperatura.**

In LSC e in LLC, comunque, non si interviene quasi mai su questo parametro, perché la maggior parte delle separazioni viene eseguita a temperatura ambiente.

L'**efficienza** rappresenta la capacità del sistema di fornire **bande strette** e dipende dai seguenti parametri:

- granulometria del riempimento**
- geometria della colonna e, in LLC, anche spessore del film del liquido di ripartizione impregnato sul supporto.**
- La **simmetria delle bande**
- la **riproducibilità**



TECNICA OPERATIVA

Preparazione della colonna

In LSC la fase stazionaria deve essere preparata attivandola (o disattivandola)

In LLC il liquido di ripartizione deve essere miscelato con il materiale di supporto secondo precisi rapporti

Riempimento per via secca

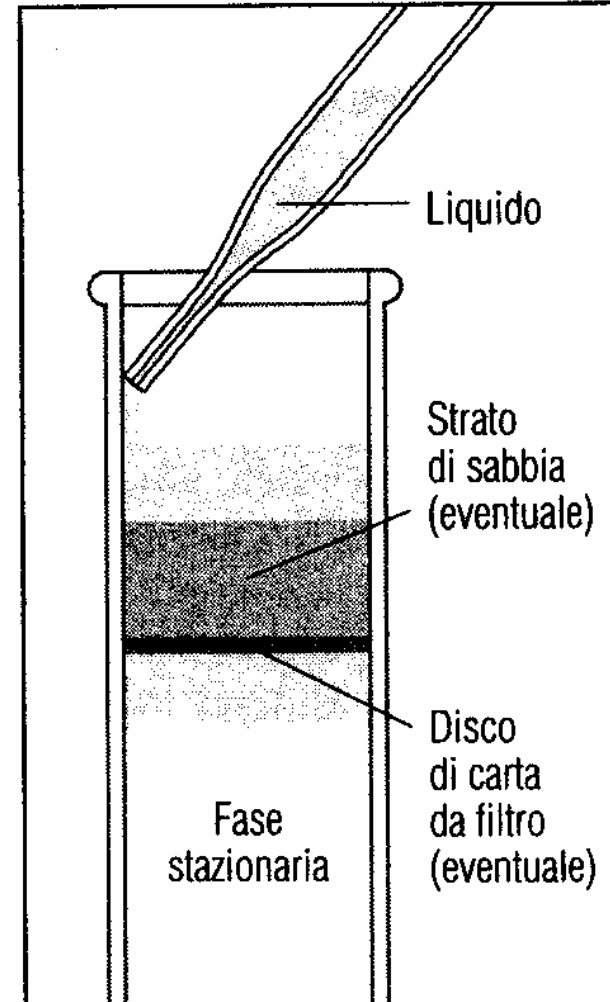
Riempimento per via umida

Caricamento del campione in colonna

Arrestare il flusso dell'eluente in modo che si crei un minimo battente di liquido in testa

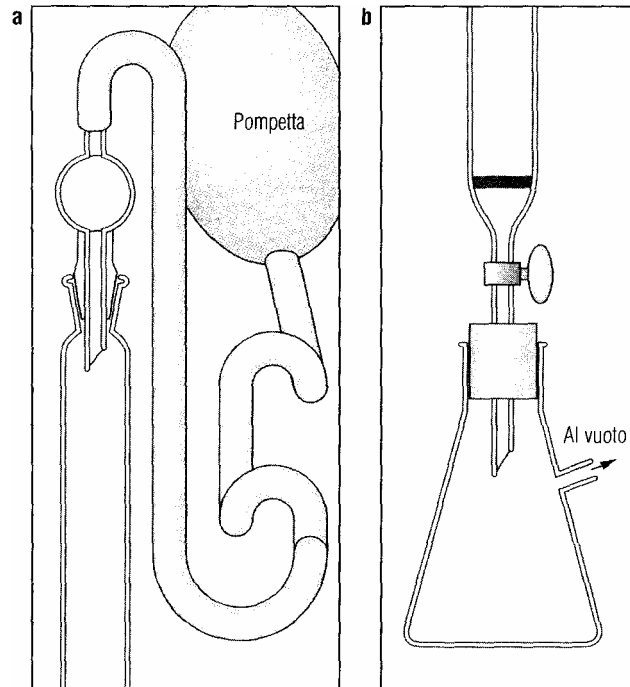
1. Si pone un disco di carta da filtro sopra al materiale di riempimento. Quindi si deposita uno strato sottile (0,5-1 cm) di materiale granulare inerte o del cotone idrofilo e lo si preme con una bacchetta di vetro. A questo punto, con una pipetta si depono il campione, disciolto nel minimo volume di eluente in modo che si distribuisca su uno strato sottile.

2. Si ritaglia un disco di carta da filtro e lo si buca in più punti con uno spillo; poi si fa assorbire il campione, disciolto nel minimo volume di eluente, e si essicca il disco. A questo punto si depono con delicatezza il disco in testa al riempimento e lo si ricopre con un sottile strato (0,5-1cm) di materiale inerte o cotone idrofilo.



Esecuzione della separazione cromatografica

Una separazione può richiedere da poche decine di minuti fino a giorni interi



Per aumentare la velocità di flusso dell'eluente in colonna si può:

- (a) usare una **pompetta** in testa alla colonna oppure
- (b) applicare il **vuoto** in uscita.

Eluizione

Consiste nell'aggiunta continua di eluente in testa alla colonna

In uscita si ottiene un flusso continuo di liquido, che può essere raccolto in frazioni di volume noto (**eluizione frazionata**) oppure inviato a un rivelatore che segnala il passaggio dei diversi componenti (**eluizione continua**).

L'eluizione può essere condotta in tre diversi modi:

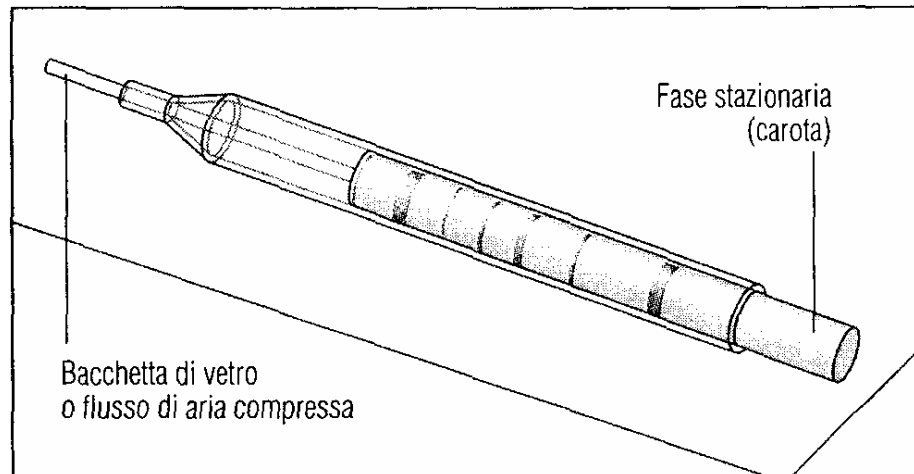
- in *condizioni isocratiche*, in cui la **polarità** dell'eluente si mantiene **costante**;
- *con più solventi in sequenza*, a polarità crescente o decrescente (secondo la fase stazionaria).
- *con gradiente*, cioè con un eluente la cui composizione varia gradualmente durante la separazione cromatografica.

Rivelazione delle bande e raccolta dei componenti

I componenti separati possono essere raccolti in due diversi modi:
per estrazione dalla fase stazionaria oppure *raccogliendo le frazioni*.

Recupero delle bande dalla fase stazionaria

Si usano colonne di vetro senza rubinetto e setto poroso oppure colonne monouso



Raccolta delle frazioni e determinazione quantitativa

Se le bande non sono visibili a occhio nudo, è necessario raccogliere diverse frazioni dell'eluente all'uscita della colonna.

Sulle frazioni raccolte si effettuano poi le consuete analisi qualitative e quantitative

- Determinazione **gravimetrica** (quantitativa)
- Determinazione con **gascromatografo** (quali/quantitativa)
- Determinazione mediante **TLC**
- Determinazione per via **spettrofotometrica** (quali/quantitativa)

I volumi relativi a ciascun componente separato sono detti **volume di eluizione totale** o di ritenzione **totale**

