

# La cromatografia

considerazioni sintetiche:

- viene utilizzata per separare materiali in grandi quantità (parecchi grammi) e piccole quantità (alcuni picogrammi)
- di solito per arrivare alla purificazione completa di una sostanza si deve usare una sequenza di più metodi cromatografici.
- Il fondamento di tutte le tecniche cromatografiche è il **coefficiente di ripartizione (o coefficiente di distribuzione)  $K_d$**  che descrive come il composto si distribuisce tra due fasi immiscibili.



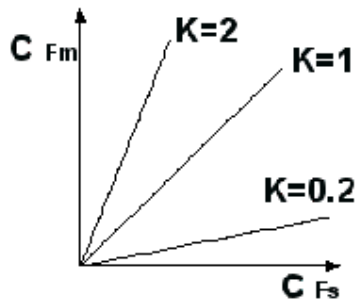
Il soluto si ripartisce tra le due fasi mobili 1 e 2 immiscibili

per una sostanza messa tra due volumi uguali di solvente A e B

- la distribuzione del composto è valida anche tra due fasi qualsiasi, solido/liquido, gas/liquido.

$$C_{Fm} = C_{Fs} \times K_d$$

Esempio: 3 diverse specie molecolari con  $K$  diverse fra le due fasi (0.2, 1, 2) possono essere separate per cromatografia.



- Il coefficiente effettivo di distribuzione definisce invece la quantità di sostanza presente in una fase e la quantità totale presente nell'altra. => coeffic.distribuzione X rapporto dei volumi delle due fasi.
- Tutti i sistemi cromatografici hanno due fasi:

la fase stazionaria solida o liquida o solida/liquida	la fase mobile liquida o gassosa, che scorre attraverso la fase stazionaria
scelte in modo che i composti da separare abbiano differenti coefficienti di distribuzione	

### I vari tipi di cromatografie:

- **d'adsorbimento:** si basa su un equilibrio d'adsorbimento tra una fase stazionaria solida e una fase mobile liquida.
- **cromatografia di ripartizione:** si basa su un equilibrio di ripartizione tra una fase stazionaria liquida ( o semiliquida) e una fase mobile liquida.
- **gas cromatografia:** si basa su una fase stazionaria liquida e una fase mobile gassosa.
- **cromatografia a scambio ionico:** si basa su un equilibrio di scambio ionico tra una resina a scambio ionico (la fase stazionaria) e una fase elettrolitica mobile.
- **cromatografia ad esclusione:** un equilibrio tra una fase liquida interna ed una esterna a un setaccio molecolare.
- **cromatografia d'affinità:** si basa su un equilibrio tra una macromolecola e una sostanza a basso peso molecolare basato sull'interazione specifica tra esse.

Nella pratica le separazioni cromatografiche si realizzano in 3 diversi modi:

- **cromatografia su colonna:** la fase stazionaria viene impaccata in colonne di vetro o di metallo.
- **cromatografia su strato sottile:** la fase stazionaria ricopre sotto forma di strato sottile piastre di vetro, plastica o di metallo.
- **cromatografia su carta:** la fase stazionaria aderisce alle fibre di cellulosa di un foglio di carta.

## Il principio della separazione cromatografica su colonna

Due sono i fattori che influenzano la risoluzione di un miscuglio di composti:

1. **La velocità di avanzamento di un composto lungo la colonna**, che dipende dal suo coefficiente effettivo di distribuzione
2. **la forma del picco di concentrazione**, che dipende dal numero di equilibramenti che si sono verificati
  - in una situazione reale l'equilibramento avviene continuamente perché l'aggiunta del solvente è continua
  - in teoria, invece, diventa utile immaginare ogni colonna cromatografica come un insieme di zone adiacenti in ognuna delle quali esiste uno spazio sufficientemente esteso tale da permettere al soluto di raggiungere la distribuzione di equilibrio tra le fasi.
  - ognuna di queste zone, come già visto nel tutorial, prende il nome di piatto teorico e la sua estensione nella colonna è chiamata altezza del piatto (H).
  - Tanto maggiore è il numero di piatti teorici, tanto più efficiente è la colonna.

Due sono i fattori che influenzano la risoluzione di un miscuglio di composti:

1. **La velocità di avanzamento di un composto lungo la colonna**, che dipende dal suo coefficiente effettivo di distribuzione
2. **la forma del picco di concentrazione**, che dipende dal numero di equilibramenti che si sono verificati
  - in una situazione reale l'equilibramento avviene continuamente perché l'aggiunta del solvente è continua
  - in teoria, invece, diventa utile immaginare ogni colonna cromatografica come un insieme di zone adiacenti in ognuna delle quali esiste uno spazio sufficientemente esteso tale da permettere al soluto di raggiungere la distribuzione di equilibrio tra le fasi.
  - ognuna di queste zone, come già visto nel tutorial, prende il nome di piatto teorico e la sua estensione nella colonna è chiamata altezza del piatto (H).
  - Tanto maggiore è il numero di piatti teorici, tanto più efficiente è la colonna.

## Cromatografia su colonna

Le colonne, note importanti: il supporto che sostiene la fase stazionaria deve essere il più vicino possibile alla base della colonna in modo da ridurre lo spazio morto sotto il supporto stesso, dove si verifica un rimescolamento delle frazioni separate dalla colonna.

Fasi stazionarie, sono disponibili in un gran numero di forme e dimensioni ed entrambe queste caratteristiche sono importanti perché influenzano la velocità di flusso ed il potere di risoluzione.

- più grosse sono le particelle, più veloce va il flusso. Particelle di piccole dimensioni hanno però un rapporto superficie-volume + elevato e quindi potenzialmente un potere di risoluzione maggiore.
- le particelle sferiche offrono caratteristiche migliori. Le dimensioni delle particelle vengono espresse in termini di larghezza di maglia (mesh). Più grande è il valore di mesh e tanto più piccola è la particella.

## Riempimento delle colonne

- è uno dei fattori + importanti, che maggiormente influenza l'efficienza della separazione.
- un riempimento della colonna mal eseguito porta a irregolarità nel flusso (channelling) e diminuisce la risoluzione.
- Il volume del liquido e delle particelle solide è detto volume del letto e il volume del liquido al di fuori della fase stazionaria è detto volume vuoto ( $V_0$ ).

## Applicazione del campione

- esistono numerosi metodi a riguardo
- il più semplice: si rimuove la maggior parte del solvente al di sopra della fase stazionaria e quello che resta lo si lascia scorrere lungo la colonna. Con una pipetta e facendo grande attenzione lo si applica nella fase stazionaria fino a quando non vi penetra. Allo stesso modo si applica un piccolo volume di solvente per spingere in colonna le ultime tracce del campione. Si aggiungono infine, con delicatezza, 5-10 cm di solvente e si collega la colonna ad un serbatoio per mantenere costante il livello.
- procedura alternativa: si fa aumentare la densità del campione aggiungendovi saccarosio a una concentrazione pari all'1%. Anche senza asportare il solvente la soluzione di campione si stratificherà facilmente. Ovviamente il saccarosio non deve interferire col metodo di separazione che stiamo utilizzando o con la successiva analisi.
- Il terzo metodo: è quello più soddisfacente e prevede l'uso di un tubo capillare e di una siringa, oppure di una pompa peristaltica in modo da portare il campione direttamente sulla superficie della colonna.

## NOTE:

- per evitare delle separazioni irregolari bisogna evitare di caricare eccessivamente la colonna.
- sarebbe opportuno anche applicare il campione nel più piccolo volume possibile in modo da avere, all'inizio della separazione il materiale contenuto in una banda molto sottile.
- il campione dovrebbe essere dissalato per evitare effetti anormali di adsorbimento.

Sviluppo della colonna: questo termine indica il passaggio dell'eluente attraverso la colonna.

Volume di eluizione,  $V_e$  = volume di fase mobile richiesto per eluire un particolare soluto

Tempo di ritenzione,  $T_t$  = è il tempo corrispondente per l'eluizione del soluto ad una determinata velocità di flusso.

NOTA: il flusso dell'eluente deve avvenire a velocità costante => si preferisce usare quindi una pompa peristaltica

Ulteriore nota: la pressione della pompa peristaltica non deve alterare la struttura della fase stazionaria

- lo sviluppo della colonna che prevede l'impiego di un solvente come eluente è noto come separazione isocratica.
- in molti casi, per aumentare il potere risolutivo dell'eluente, è necessario variare in modo continuo il pH, la forza ionica o la polarità del solvente: eluizione tramite gradiente. Per fare un gradiente si devono mescolare due solventi in una opportuna proporzione prima di immetterli nella colonna. => 1)formatore di gradienti oppure 2)si pongono due soluzioni in due recipienti separati, l'uno collegato alla colonna e mescolato da un agitatore e l'altro collegato al primo da un sifone. Saranno la differenza di pH, forza ionica, polarità della soluzione nel recipiente B rispetto a quello nel recipiente A a determinare la direzione di formazione del gradiente. Inoltre il diametro relativo dei due recipienti determinerà la forma del gradiente (lineare, convesso o concavo).

## Raccolta e analisi delle frazioni

- l'effluente può essere analizzato in continuo e la frazione contenente un particolare composto essere raccolta appena rilevata.
- l'effluente in alternativa può essere suddiviso in tante piccole frazioni (da 1 a 10 cm<sup>3</sup>) che verranno analizzate in una fase successiva, riunendo poi quelle contenenti un particolare composto.
- l'effluente dalla colonna viene fatto passare attraverso una cella a flusso di volume molto piccolo (tipicamente 8 mm<sup>3</sup>) posta nel rivelatore. Il segnale generato dal rivelatore viene raccolto sulla carta di un registratore dove ogni composto emergente è identificato da un picco caratteristico mediante il quale è possibile calcolare il tempo di ritenzione e o il volume di eluizione. Il sistema di rivelazione si può basare sull'assorbimento della luce visibile o ultravioletta (sfruttando in particolare il fatto che la maggior parte dei composti insaturi, inclusi proteine e acidi nucleici, assorbono a 254 nm), oppure sulla fluorescenza, sulla variazione dell'indice di rifrazione dell'effluente.
- il sistema che consente di raccogliere l'eluente in una serie di frazioni è detto collettore di frazioni, concepito per raccogliere un determinato volume di effluente di ciascuna provetta prima di spostare nella posizione di raccolta la provetta successiva.
- Quando l'effluente di una colonna è stato analizzato e ha fornito un tracciato sul registratore, si può dimostrare che l'area di ogni picco risulta proporzionale alla quantità di campione presente e quindi può essere utilizzata per la determinazione quantitativa dei componenti eluiti dalla colonna. L'area del picco si può misurare in base alla sua altezza ( $h_p$ ) e alla larghezza alla metà dell'altezza ( $wh_a$ ). Il prodotto di queste due dimensioni dà infatti l'area del picco. Alternativamente, considerando area e peso della carta linearmente correlate, si può ritagliare il picco della carta del registratore e pesarlo. Una volta nota l'area del picco, si può determinare la quantità di un componente usando una curva di taratura, ottenuta per cromatografia di quantità note di campione puro del composto da dosare, eseguita nelle stesse condizioni di separazione.
- Problemi attribuibili allo strumento sono la deriva della linea di base, quando il segnale cambia gradualmente nel tempo, e disturbi della linea di base quando compaiono nel segnale una serie di piccole e rapide fluttuazioni, solitamente dovute all'uso di misuratori ad alta sensibilità.

## Efficienza della colonna

- Nella pratica, man mano che il soluto scende lungo la colonna, un insieme di fenomeni cinetici e di flusso provocano un allargamento della banda del soluto tale da fornire un profilo di concentrazione all'interno della banda stessa tipico di una distribuzione gaussiana.
- In alcuni casi il picco risulta asimmetrico per eccessiva estensione del fronte del picco (fronting) o perché presenta una coda (tailing). Le cause di asimmetria del picco sono molteplici e vanno dall'applicazione di eccessiva quantità di campione sulla colonna al cattivo riempimento della stessa, da un'applicazione del campione mal eseguita, alla presenza di interazioni soluto- supporto.
- Il buon esito di ogni procedura cromatografica si valuta mediante la capacità di separare completamente (risolvere) un composto da una miscela di altri composti simili. La risoluzione del picco ( $R_s$ ) è in relazione con le proprietà dei picchi medesimi ed è definita come il rapporto tra la separazione dei picchi e la media della loro ampiezza per cui

Si può dimostrare che quando  $R_s=1.5$  la separazione dei picchi è completa al 99.7%. In molti casi, però, valori di  $R_s=1,0$ , pari ad una separazione del 98%, sono considerati soddisfacenti.

Pertanto il valore di  $N$  può essere facilmente calcolato dal tracciato cromatografico su carta. Il numero di piatti teorici può essere incrementato semplicemente aumentando la lunghezza della colonna ( $L$ ), anche se esiste un limite a questo in quanto il tempo di ritenzione e l'ampiezza del picco crescono proporzionalmente con  $L$ .

Altri parametri che definiscono il profilo di eluizione e le caratteristiche del picco sono:

$V_R$ =volume di ritenzione

$t_R$ = tempo di ritenzione

$f_v$ =velocità di flusso volumetrico

$V_m$ = volume di eluente presente in colonna ed in equilibrio con la fase stazionaria

$t_m$ =tempo di ritenzione di un soluto non trattenuto

$W_t$ = ampiezza base del picco

$$V_R = t_R \times f_v$$

$$V_m = t_m \times f_v$$

Il rapporto di capacità di fase  $K'$  (o grado di ritenzione di un soluto da parte di una fase)

## Cromatografia su strato sottile

- Su strato sottile si possono eseguire cromatografie di ripartizione, di adsorbimento, a esclusione e la cromatografie liquida ad alta risoluzione.
- La tecnica è semplice, veloce e permette l'analisi di più campioni contemporaneamente.
- Può essere impiegata sia a scopi analitici che preparativi.

## Preparazione dello strato sottile

- A una lastrina di vetro, di plastica o di metallo viene applicata una sospensione densa della fase stazionaria, normalmente in acqua, e la si stende sotto forma di uno strato sottile e uniforme per mezzo di una spatola, partendo da un lato della lastra e muovendosi verso il lato opposto.
- Lo spessore dello strato dipende dal tipo di separazione cromatografica desiderata. Nel caso di separazioni analitiche lo spessore è dell'ordine di 0,25 mm, mentre per quelle preparative può arrivare anche a 5 mm.
- Nella cromatografia d'adsorbimento, alla sospensione viene aggiunto un agente legante, come il **solfato di calcio**, che facilita l'adesione dell'adsorbente alla lastra. A eccezione della cromatografia a esclusione su strato sottile, la lastra viene essiccata per far aderire perfettamente la fase stazionaria al supporto. Nel caso di adsorbenti, l'essiccamento è condotto in una stufa a 100-120°C. Ciò serve anche a ottenere l'attivazione dell'adsorbente. È oggi commercialmente disponibile una vasta gamma di piastre già pronte.

## Applicazione del campione

- Il campione viene applicato alla lastra mediante una micropipetta o una siringa (procedura che peraltro può essere automatizzata) sotto forma di macchia, solitamente a 2,0-2,5 cm dal bordo. Il solvente viene rimosso con un leggero riscaldamento o con un asciugacapelli.

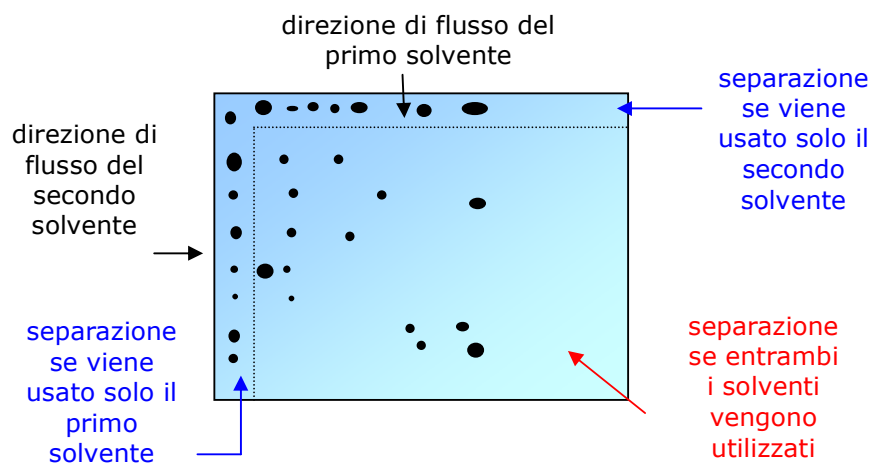
## Sviluppo della lastra

- La separazione avviene in un recipiente di vetro che contiene sul fondo circa 1,5 cm di solvente di sviluppo.
- Il solvente va lasciato equilibrare per almeno un'ora chiudendo il recipiente con un coperchio, in modo di assicurare che l'atmosfera al suo interno diventi saturata del vapore del solvente (**equilibramento**). È da notare che, senza questa fase, si avrebbe una corsa irregolare del solvente e quindi una cattiva separazione.
- Una volta avvenuto l'equilibramento, si toglie il coperchio e si posiziona verticalmente la lastra nel recipiente facendo in modo che peschi nel solvente (il lato immerso è naturalmente quello che porta il campione).
- Si ripone quindi il coperchio e la separazione avviene man mano che il solvente corre lungo la lastra. Durante questa fase, è preferibile mantenere il sistema a temperatura costante per evitare effetti anomali di corsa.
- Il maggior vantaggio della TLC è la velocità con cui si realizza la separazione: normalmente occorrono 10-30 minuti.

### NOTA:

Un metodo per migliorare la risoluzione nelle separazioni per ripartizione o adsorbimento è l'uso della *cromatografia bidimensionale*.

Il materiale da cromatografare è posto su un angolo della lastra come singola macchia e successivamente viene sviluppato in una direzione; si toglie poi la lastra e la si lascia seccare. La lastra è infine sviluppata con un altro sistema di solventi, in cui i composti da separare hanno un diverso valore di  $K_d$  in una direzione perpendicolare alla prima corsa.



La TLC può essere anche accoppiata a un sistema di elettroforesi su strato sottile (TLE).

## Rivelazione dei componenti

- Spruzzando sulla lastra acido solforico al 50% o acido solforico al 25% in etanolo, si ottiene la *carbonizzazione* della maggior parte dei composti che, pertanto, saranno visibili come macchie marroni.
- L'esame della lastra sotto *luce ultravioletta* mostrerà la posizione di sostanze che assorbono nell'ultravioletto o di composti fluorescenti. Molti adsorbenti commerciali usati per la cromatografia su strato sottile contengono un colorante fluorescente, così che, all'esame in luce ultravioletta, i composti separati appaiono come macchie blu, verdi o nere su uno sfondo fluorescente.
- Se si sottopone invece la lastra a *vapori di iodio* si mettono in evidenza i composti insaturi.
- Spruzzando infine la lastra con reattivi specifici si otterrà la colorazione di determinati composti: ad esempio, con la *ninidrina* gli aminoacidi si colorano in violetto.

## Cromatografia su carta

- Le fibre di cellulosa della carta fungono da matrice di supporto per la fase stazionaria.
- La fase stazionaria può essere acqua, o un materiale apolare (ad esempio la paraffina liquida) oppure particelle impregnate di un adsorbente solido. Esistono in commercio carte dotate di diverse caratteristiche di corsa: lente, medie e rapide. Altre sono state preventivamente sottoposte a un lavaggio acido al fine di rimuovere eventuali impurezze che potrebbero alterare i risultati di alcune analisi.
- Nella cromatografia monodimensionale, la carta va sempre sviluppata in una precisa direzione, solitamente indicata sulla confezione. Nel caso di cromatografia di adsorbimento o di ripartizione in fase normale, la carta in commercio è già disponibile nella forma adatta per la cromatografia. Al contrario, nel caso di cromatografia in fase inversa la carta va preparata subito prima dell'uso.

## Sviluppo della carta

- Sia per il metodo ascendente sia per quello discendente il solvente è posto sul fondo di un recipiente chiuso per permettere la saturazione della camera con i suoi vapori.
- Nella tecnica ascendente la procedura è identica a quella descritta precedentemente per la cromatografia su strato sottile. Il campione deve essere posto sulla carta in modo che si trovi immediatamente sopra il solvente, che, salendo per capillarità lungo la carta, provocherà la separazione dei vari componenti.
- Nella tecnica discendente, il lato della carta lungo il quale è deposto il campione è invece immerso in una vaschetta alla sommità del recipiente mentre il resto della carta è lasciato pendere verticalmente, badando però che non entri in contatto con il solvente situato sul fondo del recipiente stesso. Il solvente si muove verso il basso a causa della forza di gravità.
- La tecnica discendente presenta il vantaggio che la velocità di flusso del solvente è maggiore.
- Anche nella cromatografia su carta si può usare la tecnica bidimensionale, analogamente a quanto è stato descritto per la TLC.