

TECNICHE DI SEPARAZIONE CROMATOGRAFICHE

La cromatografia può essere definita come una tecnica di separazione di miscele, basata sulla differente distribuzione dei componenti da separare su due fasi; una di esse definita **fissa** o **fase stazionaria (FS)**, è costituita da un letto attraverso il quale si muove l'altra fase che è definita **mobile (FM)**.

La cromatografia, molto semplicemente, consiste nel porre la miscela da separare ad un'estremità della fase stazionaria e nel far scorrere, attraverso essa, la fase mobile.

Il risultato di questa operazione è la separazione delle sostanze contenute nella miscela, a causa della loro differente distribuzione, nelle due fasi.

Infatti, durante il percorso lungo la fase stazionaria le sostanze vengono rallentate in funzione delle interazioni che si generano tra i componenti del campione, la fase stazionaria e la fase mobile. Questo rallentamento è selettivo per cui, per un dato sistema di fasi mobile e stazionaria, sarà differente per ogni campione.

La fase stazionaria può essere sistemata in due modi diversi dando origine a due differenti tecniche cromatografiche denominate rispettivamente, **cromatografia su colonna** e **cromatografia su strato sottile (TLC)**.

Nella cromatografia su colonna la fase stazionaria è contenuta all'interno di un tubo di vetro in modo da formare una colonna attraverso la quale viene fatta fluire la fase mobile.

Il **tempo di ritenzione (tr)** è definito come il tempo necessario al soluto, componente della miscela, per attraversare la colonna, in condizioni di flusso costante della fase mobile.

Nella cromatografia su strato sottile la fase stazionaria è costituita da uno strato di pochi decimi di millimetro di solido disteso su una superficie piana (lastra di vetro o alluminio); sul solido la fase mobile si muove verso l'alto per azione capillare; in questo caso viene definito **R_f** (rate flow) il rapporto tra il cammino percorso dalla macchia relativa ad una sostanza ed il cammino percorso dal fronte del solvente.

La fase mobile può essere di due tipi: gassosa o liquida.

Nel primo caso si parla di **cromatografia in fase gassosa** o **gascromatografia**; nel secondo di **cromatografia in fase liquida**.

La cromatografia in fase liquida può essere ulteriormente suddivisa a seconda della natura della fase stazionaria e del processo di separazione.

In particolare quando la fase stazionaria è costituita da un solido adsorbente si parla di **cromatografia di adsorbimento**, in questo caso la separazione è basata su un susseguirsi di stadi di adsorbimento e desorbimento.

Questa tecnica di separazione sfrutta sia l'adsorbimento sia la solubilità dei componenti della miscela da separare, nei confronti di una fase stazionaria solida ed una fase mobile liquida.

Il solido può essere qualsiasi materiale che non sia solubile nella fase liquida, che sia dotato di un'elevata capacità adsorbente e che non provochi alterazioni delle sostanze da separare.

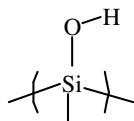
I liquidi usati come fase mobile, in questa tecnica devono esercitare un'azione solvente nei confronti della sostanza adsorbita e devono essere inerti nei confronti della fase stazionaria.

Oltre ai termini già menzionati in cromatografia sono di uso corrente altri termini; in particolare con il termine **banda**, si vuole indicare la zona di fase stazionaria occupata da uno o più componenti del campione; **eluente** è invece il termine con cui solitamente viene indicata la fase mobile ed **eluizione** quello con cui si indica l'operazione di separazione facendo passare l'eluente attraverso una colonna cromatografica.

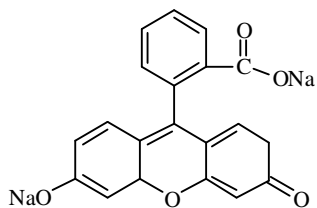
Infine il liquido uscente dall'estremità della colonna, è detto **eluato**.

In questa esperienza la separazione di una miscela di composti, viene affrontata mediante l'applicazione di due tecniche cromatografiche di adsorbimento solido-liquido (su strato sottile e su colonna).

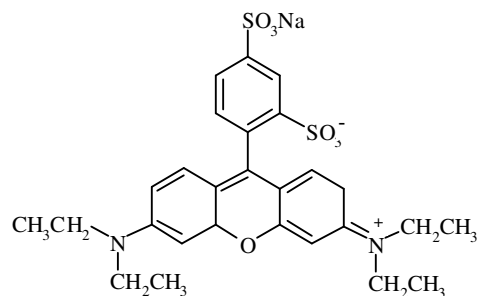
Viene data una miscela, contenente fluoresceina sodica e rodamina acida, e se ne effettua la separazione quantitativa cromatografandola mediante strato sottile ed in una colonna di gel di silice. Il gel di silice è comunemente detto silice, esso ha un carattere acido e presenta sulla superficie gruppi silanolicci molto polari.



Silice



Fluoresceina sodica



Rodamina acida

SEPARAZIONE DI DUE SOSTANZE MEDIANTE CROMATOGRAFIA SU STRATO SOTTILE (TLC)

Fase stazionaria: gel di silice.

Fase mobile: acqua distillata.

Procedimento

- Prelevare 1 ml circa delle soluzioni acquose delle sostanze da esaminare e porle in provette da saggio:
 - florosceina sodica
 - rodamina acida
 - miscela delle due sostanze
- Prelevare una piccola parte delle soluzioni tramite capillare (usare delle pipette) e trasferirle sulla lastra appoggiandovi il capillare in un punto che dista circa un centimetro dal bordo inferiore della lastra, in quanto la macchia deve essere sufficientemente in alto da non bagnarsi quando la lastra viene posta nel solvente (eluente). Il contatto del capillare con la lastra deve essere molto breve ed il capillare si deve allontanare subito per evitare che tutto il contenuto si scarichi rapidamente determinando la formazione di una macchia troppo espansa.
- Posizionare la lastra in un beacker, contenente poco meno di un centimetro di H₂O distillata (eluente), in posizione verticale e leggermente inclinata appoggiandola ad un lato della parete.
- Lasciare che l'eluente salga per capillarità fino ad un centimetro dal bordo superiore.
- Togliere la lastra dal beacker e lasciare asciugare all'aria.
- Dato che le sostanze separate sono colorate si osservano delle macchie a distanze diverse;

Quesiti e Problemi

- Commentare i risultati ottenuti.

SEPARAZIONE DI DUE SOSTANZE MEDIANTE CROMATOGRAFIA DI ADSORBIMENTO SU COLONNA

Fase stazionaria: gel di silice.

Fase mobile: acqua distillata.

Procedimento

Preparazione della colonna cromatografia

- Introdurre in fondo alla colonna, aiutandosi con una bacchetta di vetro, un piccolo batuffolo di cotone idrofilo, che serve a bloccare la fuoriuscita del solido.
- Aggiungere circa 10 ml di H₂O distillata e muovere con la bacchetta lentamente il cotone in modo da eliminare l'aria. Lasciare la bacchetta dentro la colonna sopra il cotone senza comprimere.
- Pesare in una beuta da 250 ml circa 70 g di SiO₂ (fase stazionaria), unire circa 150 ml di H₂O distillata ed omogeneizzare molto bene.
- Introdurre rapidamente la miscela ottenuta nella colonna, tenendo sul fondo, mediante la bacchetta di vetro, il cotone.
- Terminata l'aggiunta aprire il rubinetto, al fine di eliminare il solvente in eccesso. Mescolare la fase stazionaria (facendo attenzione a non muovere il cotone) ed estrarre la bacchetta di vetro. Lasciare scorrere nella colonna l'acqua distillata fino al raggiungimento della fase stazionaria poi chiudere il rubinetto. Evitare di mandare a secco il solido, in quanto se si provocano delle fratture all'interno della colonna si creano dei percorsi preferenziali, che portano ad una cattiva separazione delle sostanze.
- Per eliminare la silice, eventualmente rimasta sulle pareti della colonna, lavare lentamente con H₂O distillata per mezzo di una pipetta. Aprire nuovamente il rubinetto per eliminare l'acqua aggiunta.

Separazione della due sostanze

- Mettere in una provetta da saggio 4 ml circa della soluzione acquosa della miscela da separare.
- Introdurre la soluzione molto lentamente con una pipetta, cercando di distribuirla in modo uniforme, all'interno della colonna.
- Terminata l'aggiunta, aprire il rubinetto per fare assorbire la soluzione sulla fase stazionaria, poi richiuderlo.
- Lavare con alcuni ml di H₂O distillata, sempre aiutandosi con una pipetta, le pareti della colonna in modo da eliminare eventuali tracce di soluzione. Aprire il rubinetto e fare assorbire nuovamente, poi richiudere.
- Riempire la colonna lentamente con H₂O distillata e aprire il rubinetto.
- Nella colonna compaiono due zone ben distinte, quella superiore é rosa fucsia grazie alla presenza della rodamina acida, quella inferiore é gialla grazie alla presenza della fluoresceina.
- Raccogliere quantitativamente e separatamente le due sostanze con delle beute.

Quesiti e Problemi

- Commentare i risultati ottenuti.