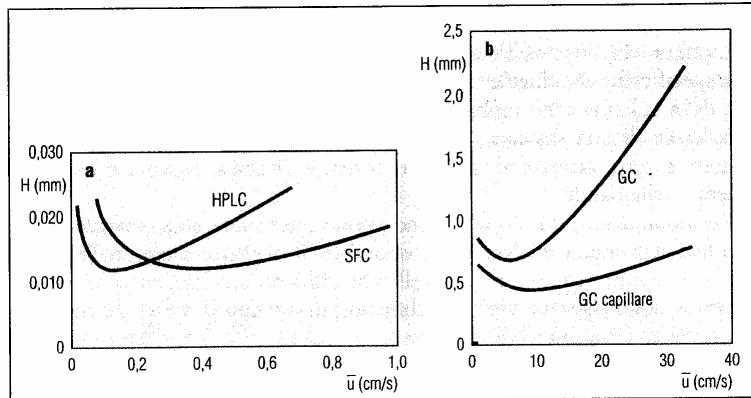


Equazione di Van Deemter



- le scale hanno ordini di grandezza diversi: precisamente, l'altezza del piatto teorico è molto minore in HPLC o in SFC rispetto alla gascromatografia (GC);
- le curve presentano un andamento molto simile, che può far pensare a una **iperbole** o anche a una **parabola**.

$$H=f(\bar{u})$$

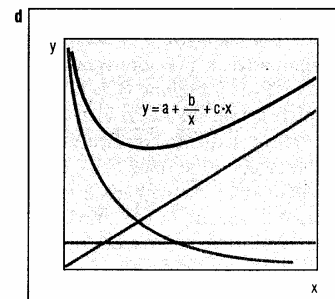
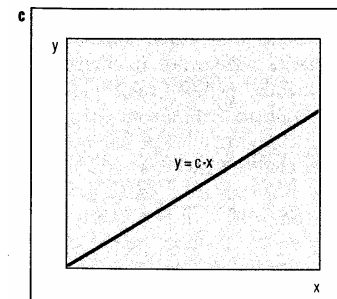
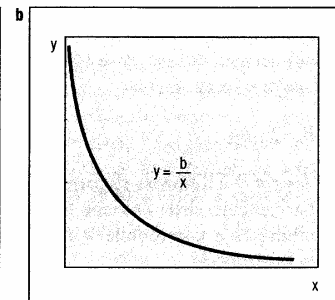
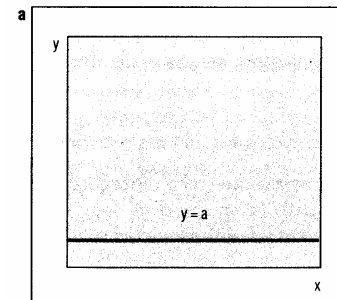
$$Y=a+\frac{b}{x}+cx$$

$$Y=a$$

$$Y=\frac{b}{x}$$

$$Y=cx$$

$$H=A+\frac{B}{\bar{u}}+C\bar{u}$$



$$H = A + \frac{B}{\bar{u}} + C\bar{u}$$

$A = 2\lambda d_p$ Nelle colonne impaccate A è associato ai percorsi multipli

λ è una costante associata alla granulometria (diametro e distribuzione) e all'impaccamento della colonna, d_p il diametro medio delle particelle del riempimento.

In GC capillare il termine è trascurabile in LC capillare non è rilevante!

$B = 2\gamma D_M$ Il parametro B è associato alla diffusione molecolare longitudinale

γ è il fattore di tortuosità (o di ostruzione), che dipende dall'impaccamento della colonna (vale a dire dalla geometria degli spazi disponibili per la fase mobile) • D_M il coefficiente di diffusione del solvente nella fase mobile.

Tabella 12.2

Proprietà fisiche degli stati dispersi della materia (gas, fluidi supercritici e liquidi) usati come fase mobile nelle separazioni cromatografiche			
Stato fisico	Densità (g/cm ³)	Coefficiente di diffusione (cm ² /s)	Viscosità (g/cm · s)
Gas	10 ⁻³	10 ⁻¹	10 ⁻⁴
Fluidi supercritici	0,3-0,9	10 ⁻³ · 10 ⁻⁴	10 ⁻³ · 10 ⁻⁴
Liquidi	1	< 10 ⁻⁵	10 ⁻²

* I dati di questa tabella saranno utili per stabilire degli interessanti confronti fra GC, SFC e HPLC.

$$H = A + \frac{B}{\bar{u}} + C\bar{u}$$

Il parametro C è associato alla **resistenza al trasferimento di massa**

$$C = C_S + C_M$$

C : contributo del trasferimento di massa nella fase stazionaria (C_S) e in quella mobile (C_M).

$$C_S = \frac{qkd_f^2}{(1+k)^2 D_S}$$

q è una costante che tiene conto della **non uniformità della fase stazionaria** e dipende dalla diversa geometria dei pori del materiale di supporto della fase stazionaria

k il fattore di ritenzione

d_f lo spessore massimo della fase stazionaria

D_S il coefficiente di diffusione della sostanza eluita nella fase stazionaria.

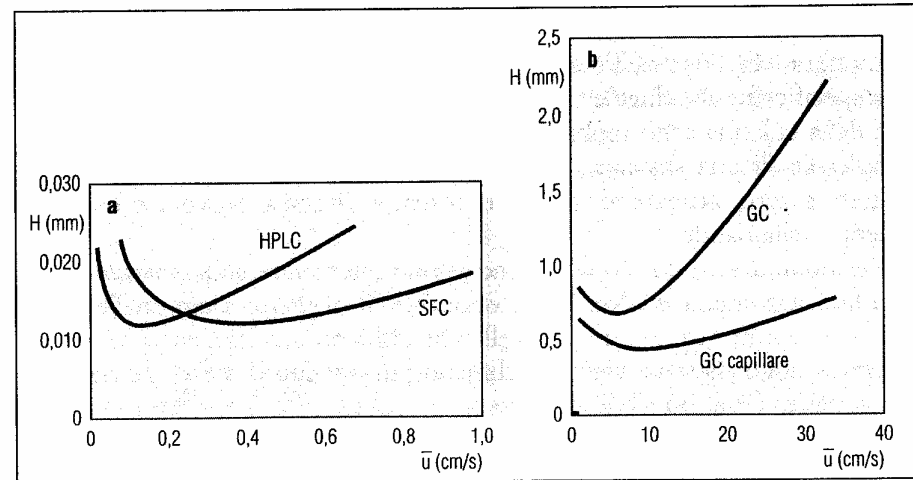
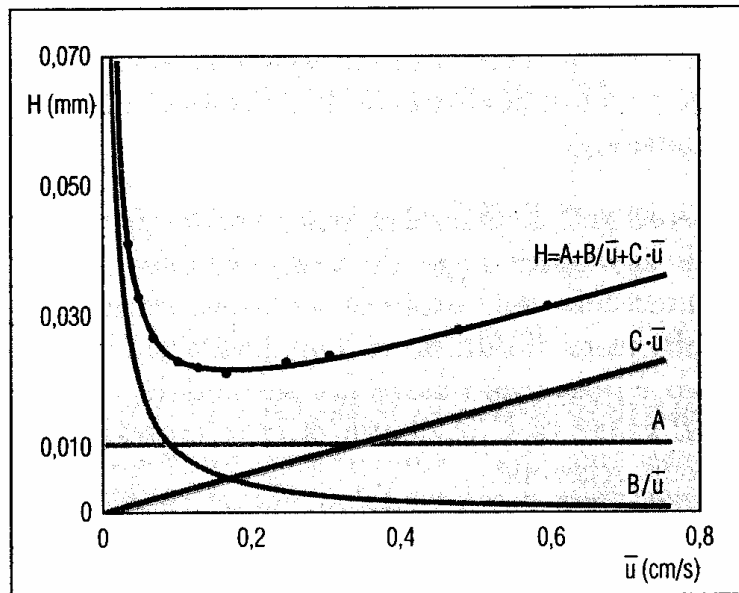
$$C_M = \frac{\omega d_p^2}{D_M}$$

ω è una costante che dipende dal tipo di impaccamento e dalla geometria della colonna

In GC D_M è grande e il termine in C trascurabile
Invece in HPLC è determinante!!

$$H = A + \frac{B}{\bar{u}} + (C_S + C_M)\bar{u}$$

$$H = 2\lambda d_p + \frac{2\gamma D_M}{\bar{u}} + \left(\frac{qkd_f^2}{(1+k)^2 D_S} + \frac{\omega d_p^2}{D_M} \right) \bar{u}$$



Ottimizzazione dei parametri operativi per il miglioramento dell'efficienza

Principali parametri operativi su cui intervenire:

- velocità
- caratteristiche fisiche della FM
- pressione della FM;
- diametro delle particelle della FS (o del supporto)
- impaccamento della FS;
- temperatura e geometria della colonna.

Velocità della fase mobile $H_{\min} = A + 2\sqrt{BC}$ $\bar{u}_{\text{opt}} = \sqrt{\frac{B}{C}}$

I valori di A , B e C si ricavano sperimentalmente:

$$N = 5.545 \left(\frac{t_R}{w_h} \right)^2$$

$$H = \frac{L}{N}$$

$$H = A + \frac{B}{\bar{u}} + C\bar{u}$$

Per tre valori di u

Sistema di 3 eq in 3 incognite

Caratteristiche fisiche della fase mobile

In **GC** il termine B incide sensibilmente su H e quindi, se si vuole ridurre la diffusione molecolare (ovvero il coefficiente D_m), la fase mobile gassosa deve avere una **elevata densità**. In **LC** si presenta il problema opposto, perché il basso valore di D_m rende praticamente nullo il termine B , ma fa aumentare il termine C_M , per cui è consigliabile usare eluenti a **bassa viscosità**.

Pressione della fase mobile

Il controllo della pressione di ingresso della fase mobile (da cui dipende la stabilità del flusso) è essenziale per assicurare un'adeguata riproducibilità di analisi. In **GC** su colonne impaccate la caduta di pressione fra l'ingresso e l'uscita della colonna può essere calcolata mediante la relazione:

$$\Delta P = \frac{\eta L \bar{u}}{B_0}$$

η è la viscosità della fase mobile (che deve essere bassa)

L la lunghezza della colonna

B_0 la **permeabilità specifica cromatografica**

In **GC** e **LC** capillare il ΔP è trascurabile!

Diametro delle particelle della fase stazionaria (o del supporto)

Quasi tutti i termini della Van Deemter suggeriscono l'uso di una granulometria ridotta e uniforme ma potrebbe venir meno la permeabilità B_0 !

Impaccamento della fase stazionaria

E' talmente determinante che si preferisce l'uso di colonne preimpaccate

Fase stazionaria liquida

Quando si lavora con fasi stazionarie liquide depositate su supporto solido granulare, il liquido prescelto deve essere poco viscoso e deve formare un film molto sottile

Temperatura della colonna

$$H = a + \frac{b}{T} + cT$$

Geometria della colonna

In genere diminuendo il diametro della colonna migliora l'efficienza

Risoluzione

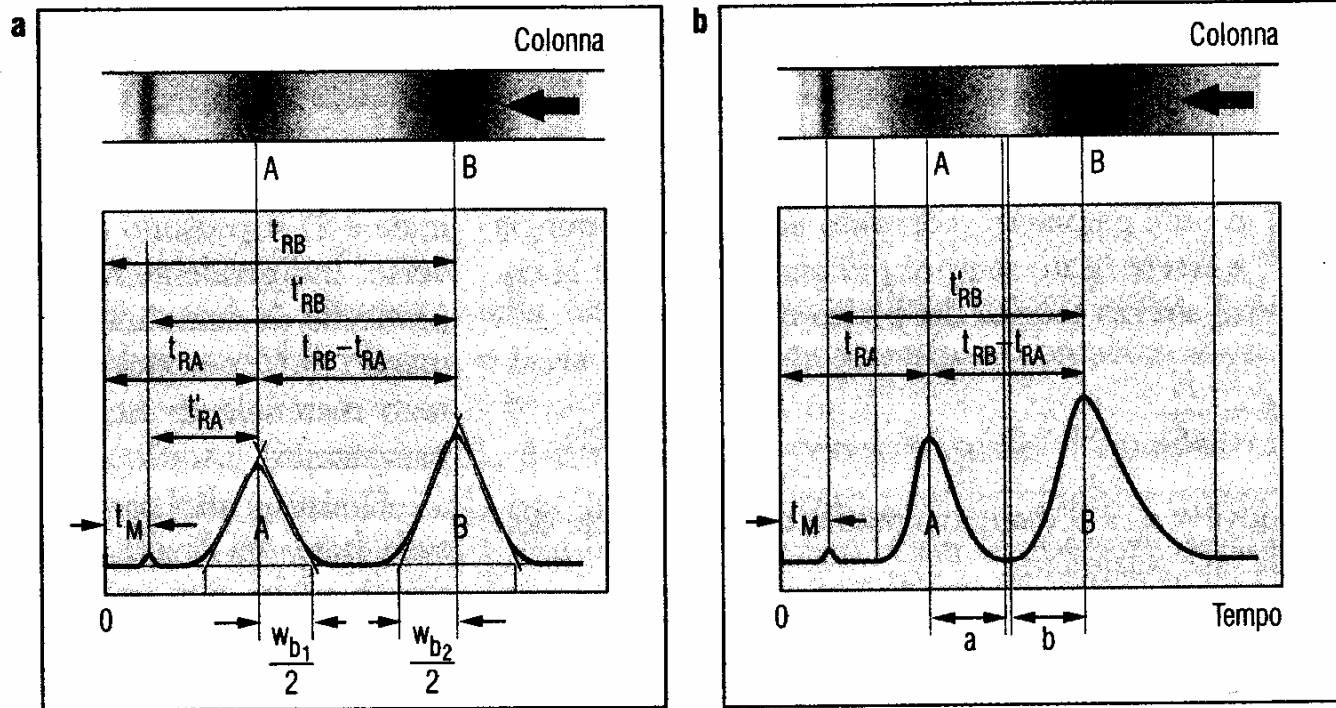
R_S , Indica il **grado di separazione dei picchi** ottenuti al rilevatore di un sistema cromatografico

$$R_S = \frac{t_{R2} - t_{R1}}{\frac{w_{b1} + w_{b2}}{2}} \qquad R_S = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{w_{b1} + w_{b2}}$$

Espressa in funzione della deviazione standard di ciascun picco diventa:

$$R_S = \frac{(t_{R2} - t_{R1})}{2(\sigma_{b1} + \sigma_{b2})}$$

Nel caso (reale) di picchi asimmetrici



$$R_s = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{a + b}$$

Se $R_s = 0.8$ la sovrapposizione è del 2%
 Se $R_s = 1.5$ la sovrapposizione è del 0.3%

Utilizzando la larghezza del picco a metà altezza w_h si ha:

$$R_h = 1.699R_s$$

La **risoluzione** può essere messa in relazione al **numero dei piatti teorici N**, alla **selettività α** e al **fattore di ritenzione k** .

$$R_s = \frac{1}{4} \sqrt{N_2} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k_2}{1 - k_2} \right)$$

Ottimizzazione della risoluzione:

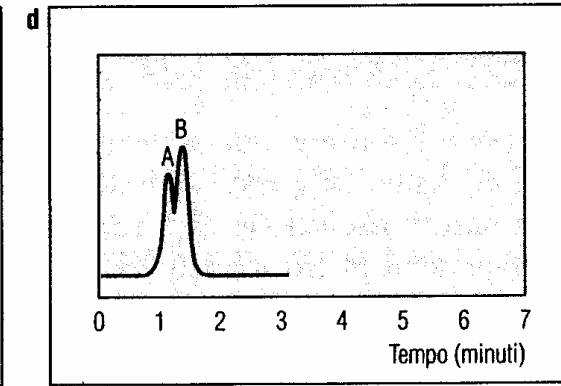
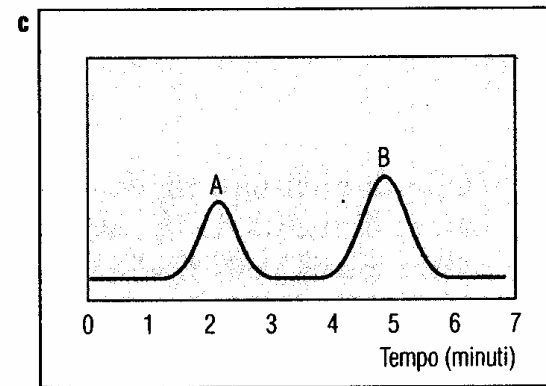
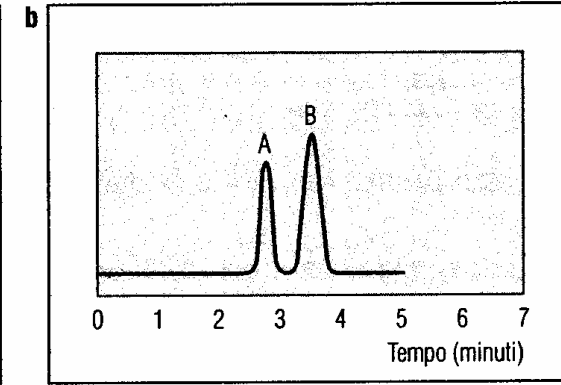
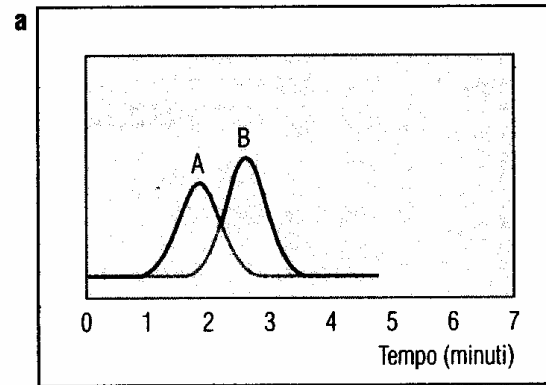
Scegliere una colonna con un numero di piatti elevato

Ottimizzare il fattore di ritenzione modificando la fase stazionaria e la mobile (1.5-5)

Variare la temperatura (α e $k f(T)$)

In GC N è talmente grande che ci si può permettere di lavorare con α piccolo

Effetto della selettività, dell'efficienza e del fattore di ritenzione sulla risoluzione



(a) Selettività ed efficienza insufficienti: i picchi dei componenti A e B si sovrappongono, (b) Se si migliora l'efficienza (per esempio facendo aumentare N , semplicemente allungando la colonna), la risoluzione diventa accettabile: le basi dei picchi si restringono e i picchi risultano nettamente separati, (c) Se si migliora la selettività (per esempio cambiando la fase stazionaria), si ottiene una buona risoluzione: i tempi di ritenzione dei due componenti cambiano e i picchi sono separati. (d) Nonostante la colonna abbia una buona efficienza, la risoluzione è insoddisfacente a causa del basso valore di k . Per migliorare la risoluzione, può essere sufficiente iniettare una minore quantità di miscela.

I vari parametri cromatografici (α , K_C , k , N) possono essere modificati anche *in corsa*

- in GC, anziché lavorare in **condizioni isoterme**, si può effettuare una **programmazione di temperatura**;
- in HPLC, dove la temperatura non ha effetti di grande rilevanza, anziché lavorare in **condizioni isocratiche**, si può effettuare una **programmazione di polarità** dell'eluente (Gradiente di polarità)
- in SFC, si può agire sia sulla **temperatura** sia sulla **composizione** dell'eluente e anche sulla **pressione** del fluido supercritico.

Tempi di lavoro

Se $R_S > 1$ si ottiene una buona separazione, ma è importante minimizzare i tempi di ritenzione

$$t_M = \frac{L}{\bar{u}}$$

$$t_R = t_M(1+k)$$

$$L = NH$$

$$t_R = \frac{NH}{\bar{u}}(1+k)$$

$$N = 16R_S^2 \left(\frac{\alpha}{\alpha-1} \right)^2 \left(\frac{1-k}{k} \right)^2$$

$$t_R = 16R_S^2 \left(\frac{\alpha}{\alpha-1} \right)^2 \frac{(1-k)^3}{k^2} \frac{H}{\bar{u}}$$

Il tempo di ritenzione dipende da molti fattori, per ridurre i tempi di lavoro bisogna intervenire su essi

$$t_R = 16R_S^2 \left(\frac{\alpha}{\alpha-1} \right)^2 \frac{(1-k)^3}{k^2} \frac{H}{\bar{u}}$$

Il tempo di ritenzione dipende da molti fattori, per ridurre i tempi di lavoro bisogna intervenire su essi

R_S deve essere compreso tra 1 e 1.5

Per minimizzare $\left(\frac{\alpha}{\alpha-1} \right)^2$ bisogna tenere la **selettività a valori elevati**, in ogni caso >1

Il termine $\frac{(1-k)^3}{k^2}$ assume il minimo per $k=2$, sono accettabili valori compresi tra 1.5 e 3

