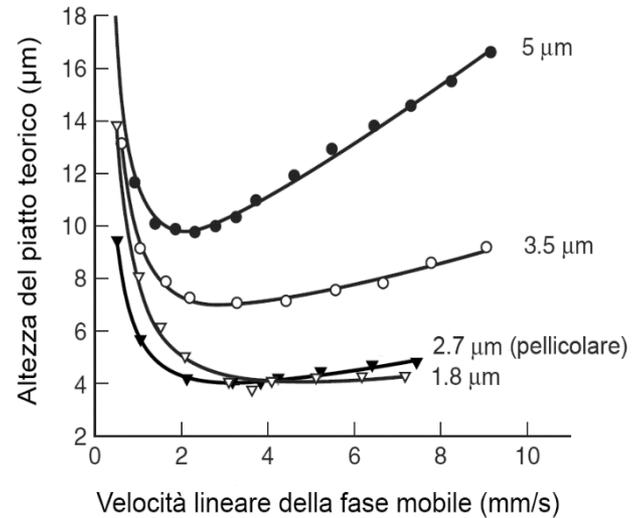


# CROMATOGRAFIA



L'equazione di Van Deemter correla l'efficienza di una colonna cromatografica con la velocità della fase mobile



Le tecniche analitiche cromatografiche sono impiegate sia in semplici analisi visuali che in complesse determinazioni strumentali



In gascromatografia vengono impiegate colonne capillari ad elevata efficienza che permettono di analizzare anche miscele molto complesse

I rivelatori basati su spettrometria di massa permettono di identificare gli analiti separati con una tecnica cromatografica



# CROMATOGRAFIA

## PRINCIPI DI CROMATOGRAFIA

### *Che cos'è una tecnica cromatografica?*

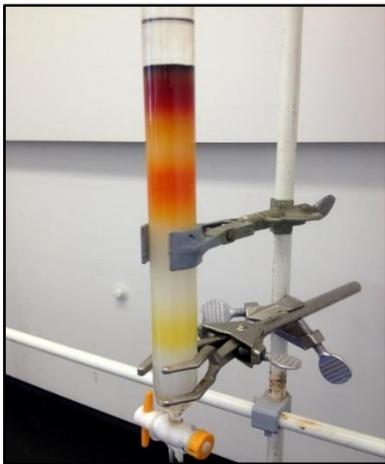
Le tecniche cromatografiche sono **tecniche separative** usate per analizzare miscele complesse di sostanze.

Le applicazioni della cromatografia vanno dal monitoraggio di una reazione chimica alla purificazione dei prodotti di una sintesi, alle analisi quali-quantitative di campioni complessi.

Per effettuare analisi quantitative un sistema cromatografico richiede un **rivelatore**. Poiché gli analiti giungono al rivelatore singolarmente, esso non deve necessariamente essere selettivo (il rivelatore ideale per cromatografia dovrebbe **rispondere a qualsiasi analita**).

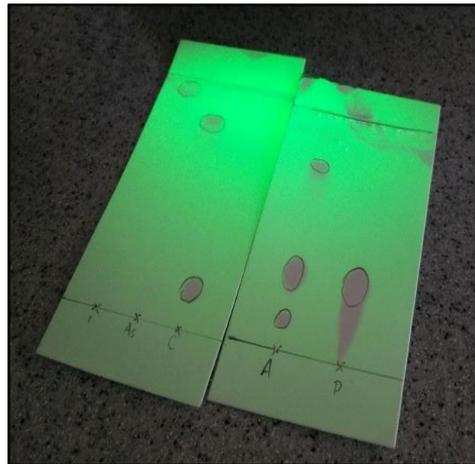
### **Cromatografia su colonna**

(separazione di prodotti di reazione)



### **Cromatografia su strato sottile (TLC)**

(analisi visuale qualitativa e semiquantitativa)



### **GC e HPLC**

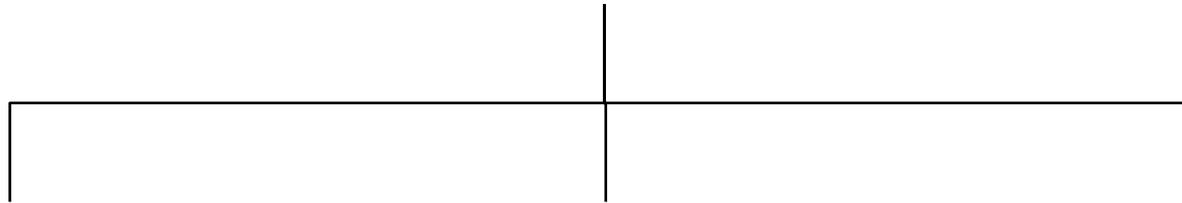
(analisi strumentale quali-quantitativa)



## PRINCIPI DI CROMATOGRAFIA

Tutte le tecniche cromatografiche prevedono una **fase stazionaria** e una **fase mobile** in movimento attraverso la fase stazionaria.

Sono classificabili per **formato**, **natura della fase mobile** e **meccanismo di ritenzione** (ovvero il processo che determina la separazione degli analiti).



### **Formato**

**Cromatografia planare:** la fase stazionaria è planare (es. un foglio di carta o uno strato di materiale cromatografico depositato su di un supporto piano).

**Cromatografia su colonna:** la fase stazionaria è contenuta in una colonna.

### **Natura della fase mobile**

**Cromatografia liquida:** la fase mobile è un liquido.

**Gas Cromatografia:** la fase mobile è un gas.

### **Meccanismo di ritenzione**

I meccanismi di ritenzione sono: **adsorbimento, ripartizione, scambio ionico, esclusione dimensionale, affinità.**

Questo vale per la cromatografia liquida, in gas cromatografia sono possibili solamente ritenzione per adsorbimento e per ripartizione.

# CROMATOGRAFIA

## PRINCIPI DI CROMATOGRAFIA

Le origini della cromatografia risalgono agli inizi del XX secolo, quando il botanico russo Mikhail Semyonovich Tsvet sviluppò questa tecnica per separare i pigmenti in un estratto di foglie verdi usando carbonato di calcio come fase stazionaria e una miscela etere di petrolio/etanolo come fase mobile.

Il termine cromatografia deriva dal greco kromatos (colore) e graphos (scrivere) e significa letteralmente "scrittura con il colore".



Clorofilla b  
Clorofilla a  
Xantofillina

Carotene

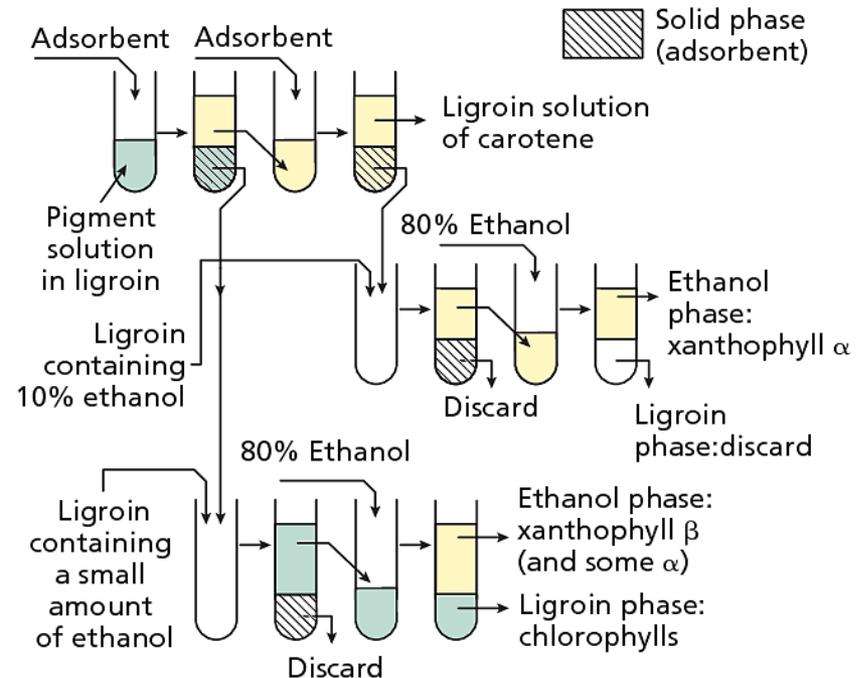
Cromatografia in colonna di pigmenti fogliari

"Spinach chromatography" (parti 1 - 3):

<https://www.youtube.com/watch?v=EErXChi-fvk>

<https://www.youtube.com/watch?v=aZnLYGDJiZE>

<https://www.youtube.com/watch?v=wTIT7RifcPE>



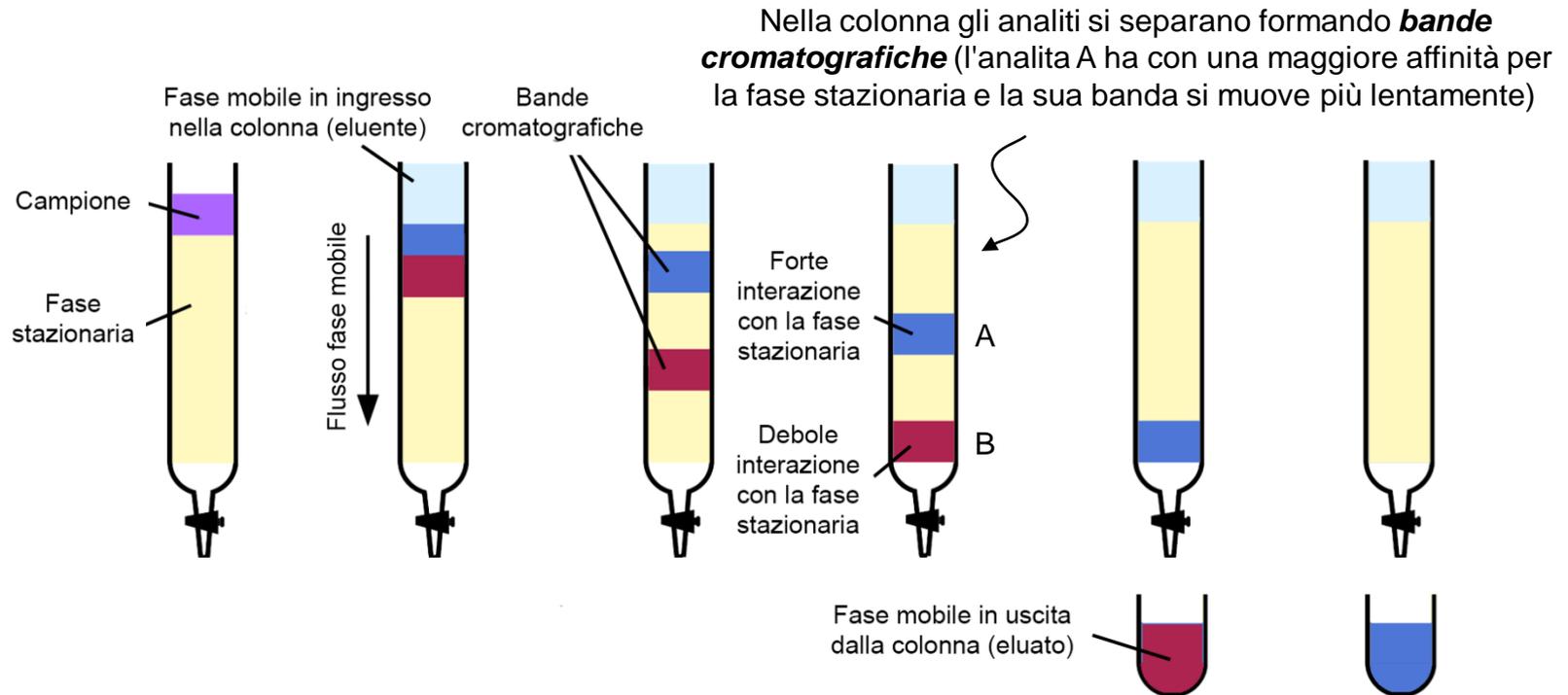
Procedura di adsorbimento/estrazione usata da Tsvet per isolare i diversi pigmenti fogliari

# CROMATOGRAFIA

## PRINCIPI DI CROMATOGRAFIA

### *Perché gli analiti si separano?*

La cromatografia si basa sulla **diversa affinità degli analiti** per le due fasi. Gli analiti sono trascinati dalla fase mobile, ma la loro velocità di migrazione dipende dalle loro interazioni con la fase mobile e quella stazionaria (sostanze con affinità diverse sono quindi separate durante il processo cromatografico).



Separazione di due analiti mediante cromatografia in colonna

# PRINCIPI DI CROMATOGRAFIA

## *Come si descrive l'interazione di un analita con le due fasi?*

L'affinità di un analita per la fase mobile e la fase stazionaria dipende dalla natura delle fasi e dalle caratteristiche dell'analita.

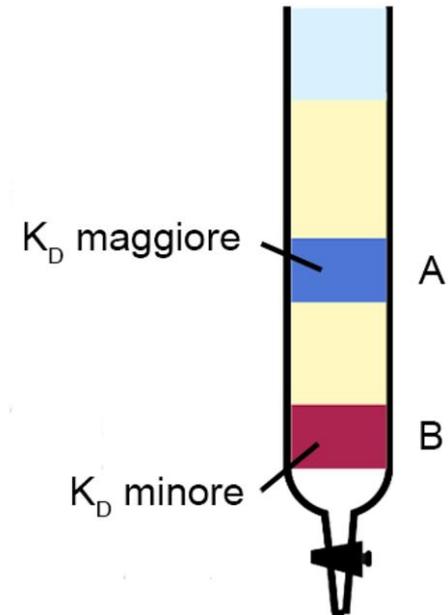
Talvolta (es. gascromatografia) l'analita interagisce **solo con la fase stazionaria**.

L'equilibrio che si instaura in una analisi cromatografica è descritto dalla **costante di distribuzione  $K_D$** .

$$K_D = \frac{[\text{analita}]_{\text{fase stazionaria}}}{[\text{analita}]_{\text{fase mobile}}}$$

Maggiore è il valore di  $K_D$  (ovvero maggiore è l'affinità dell'analita per la fase stazionaria, più grande è la frazione di analita legata alla fase stazionaria e minore è la velocità di migrazione.

La costante  $K_D$  può essere ricavata dalle caratteristiche della separazione cromatografica.



# CROMATOGRAFIA

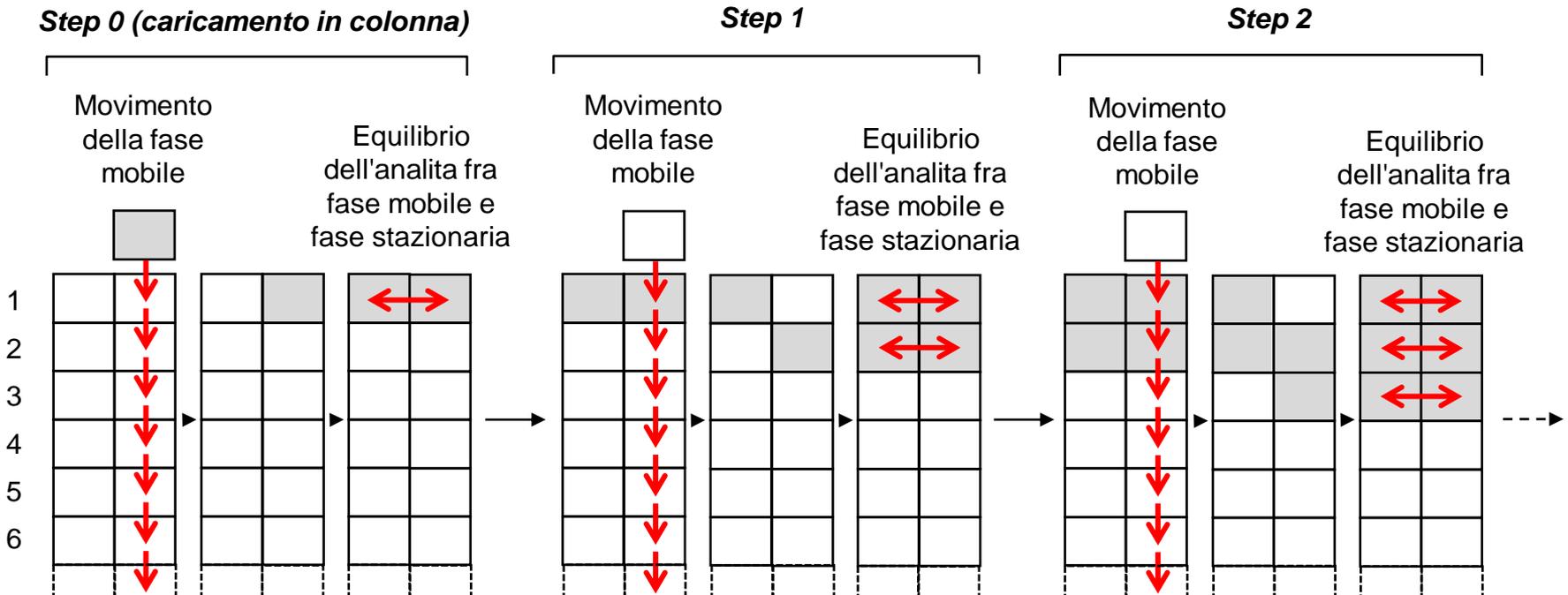
## PRINCIPI DI CROMATOGRAFIA

### ***Come si forma una banda cromatografica?***

La formazione delle bande cromatografiche può essere simulata in un modello nel quale la colonna è suddivisa in sezioni discrete.

Queste sezioni verranno in seguito definite ***piatti teorici***.

Nel modello il processo cromatografico avviene in stadi consecutivi: prima la fase mobile con l'analita si muove lungo la colonna, poi l'analita si distribuisce fra le due fasi in base alla sua costante di distribuzione.



# CROMATOGRAFIA

## PRINCIPI DI CROMATOGRAFIA

### Risultati ottenuti per analiti con differente $K_D$

		$K_D = 0,11$						$K_D = 1$						$K_D = 9$					
		Step						Step						Step					
		0	1	2	3	4	5	0	1	2	3	4	5	0	1	2	3	4	5
1		100,00	9,91	0,98	0,10	0,01	0,00	100,00	50,00	25,00	12,50	6,25	3,13	100,00	90,00	81,00	72,90	65,61	59,05
2			90,09	17,86	2,65	0,35	0,04		50,00	50,00	37,50	25,00	15,63		10,00	18,00	24,30	29,16	32,81
3				81,16	24,13	4,78	0,79			25,00	37,50	37,50	31,25			1,00	2,70	4,86	7,29
4					73,12	28,98	7,18				12,50	25,00	31,25				0,10	0,36	0,81
5						65,87	32,64					6,25	15,63					0,01	0,05
6							59,35						3,13						0,00



Il valore riportato per ogni sezione è la somma delle quantità di analita contenute nella fase mobile ed in quella stazionaria (la quantità di analita caricata in colonna è posta pari a 100)

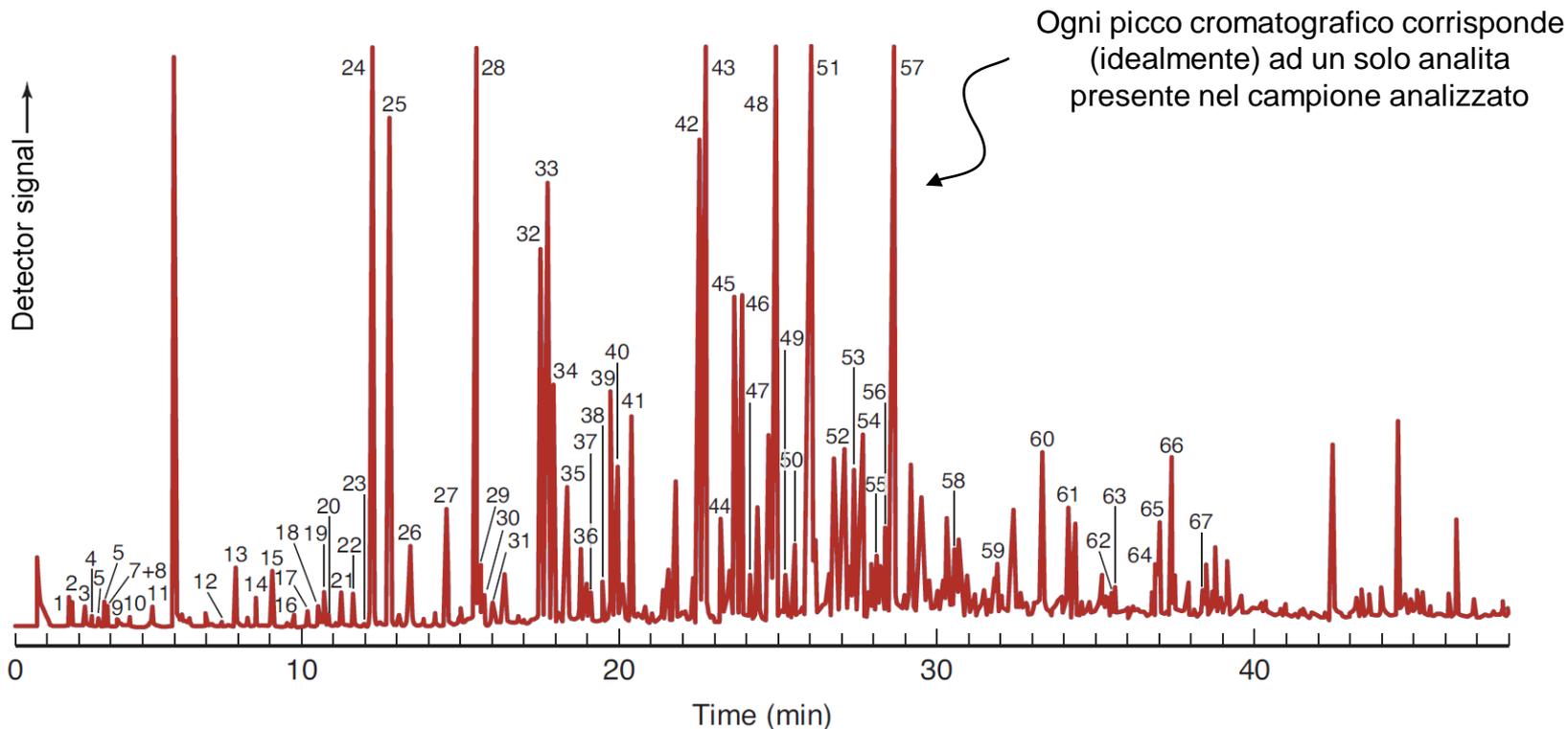
Nel calcolo si assume che i volumi di fase mobile e fase stazionaria in una sezione siano uguali, quindi

$$K_D = \frac{[\text{analita}]_{\text{fase stazionaria}}}{[\text{analita}]_{\text{fase mobile}}} = \frac{\text{moli analita}_{\text{fase stazionaria}}}{\text{moli analita}_{\text{fase mobile}}}$$

In una colonna reale in genere non è così ma le conclusioni restano valide almeno dal punto di vista qualitativo.

### *Che cos'è un cromatogramma?*

Il risultato di una analisi cromatografica strumentale è un **cromatogramma**, un grafico che riporta il segnale misurato da un rivelatore all'uscita della colonna in funzione del tempo trascorso dall'inizio dell'analisi (ovvero dall'ingresso del campione in colonna).



## ANALISI QUALITATIVA E QUANTITATIVA

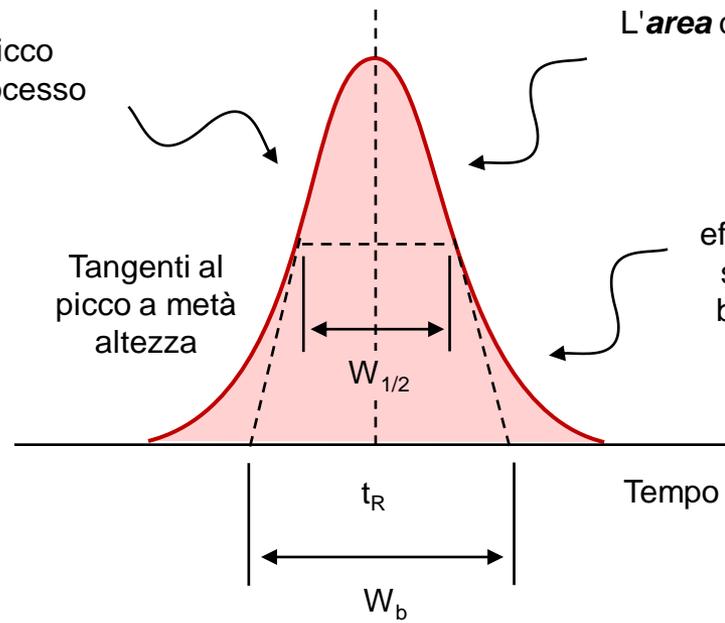
In condizioni ideali un picco cromatografico ha una forma assimilabile ad una Gaussiana e contiene le informazioni necessarie per una **analisi quali-quantitativa** e per **valutare le caratteristiche del sistema cromatografico**.

Il **tempo di ritenzione** dipende dalle interazioni dell'analita con la fase stazionaria e la fase mobile (quindi dalla natura dell'analita)

La **simmetria** del picco indica l'idealità del processo cromatografico

L'**area** del picco è proporzionale alla quantità di analita

La **larghezza** del picco è legata alla efficienza del sistema cromatografico (di solito si considerano la larghezza alla base  $W_b$  o quella a metà altezza  $W_{1/2}$ )



**Come si effettua una analisi qualitativa?**

Molti rivelatori impiegati in cromatografia non forniscono informazioni tali da permettere la **identificazione diretta** di un analita.

Solo i rivelatori basati su spettrometria di massa permettono di **confermare l'identità** di un analita attraverso massa molecolare e/o spettro di frammentazione. Altri rivelatori (es. spettrofotometri UV-Vis) forniscono informazioni utili ma non sempre sufficienti per una identificazione certa.

L'analisi qualitativa è perciò spesso basata sul **confronto dei cromatogrammi** ottenuti nelle stesse condizioni per il campione e per miscele standard di analiti. La ritenzione di un analita è infatti **legata alle sue caratteristiche chimico-fisiche**.

Composizione di una miscela standard di analiti per la determinazione qualitativa mediante gascromatografia dei principali additivi nelle benzine

ASTM D4815 mix	
Compound	Concentration
1,2 Dimethoxyethane	6 +/- .3 wt%
tert-amyl alcohol	7.3 +/- .365 wt%
benzene	5 +/- .25 wt%
1-butanol	5 +/- .25 wt%
2-butanol	7.3 +/- .365 wt%
tert-butyl ethyl ether	4 +/- .2 wt%
ethanol	7.3 +/- .365 wt%
isobutyl alcohol	7.3 +/- .365 wt%
isopropyl alcohol	7.3 +/- .365 wt%
isopropyl ether	4 +/- .2 wt%
methanol	7.3 +/- .365 wt%
methyl t-butyl ether	4 +/- .2 wt%
methylcyclopentane	4 +/- .2 wt%
2-methyl-2-propanol	7.3 +/- .365 wt%
1-propanol	7.3 +/- .365 wt%
tert-amyl methyl ether	7.3 +/- .365 wt%

**Quali parametri si usano per una analisi qualitativa?**

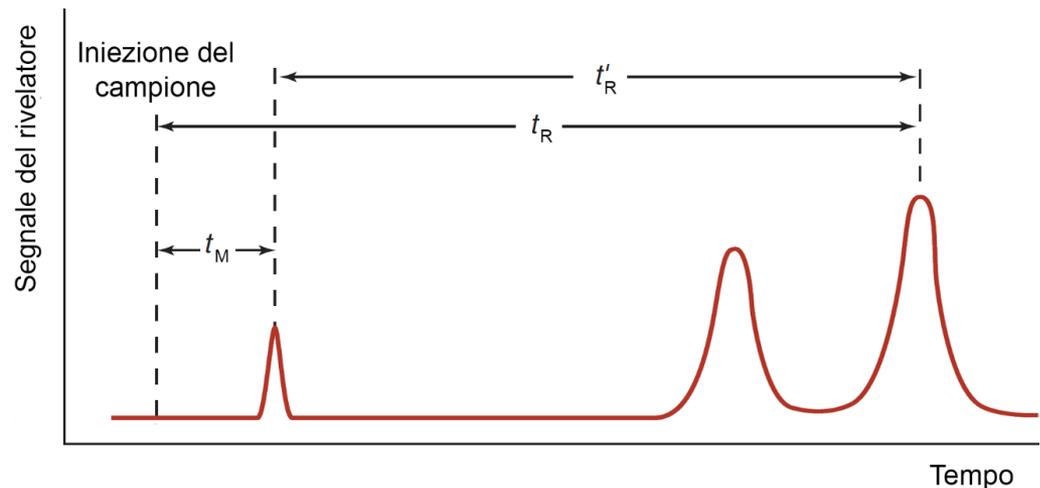
Il più comune indice di ritenzione usato per confrontare cromatogrammi è il **tempo di ritenzione** ( $t_R$ ), ovvero il tempo impiegato dall'analita per percorrere la colonna.

In alternativa si può usare il **tempo di ritenzione corretto** ( $t'_R$ ), definito dalla

$$t'_R = t_R - t_M$$

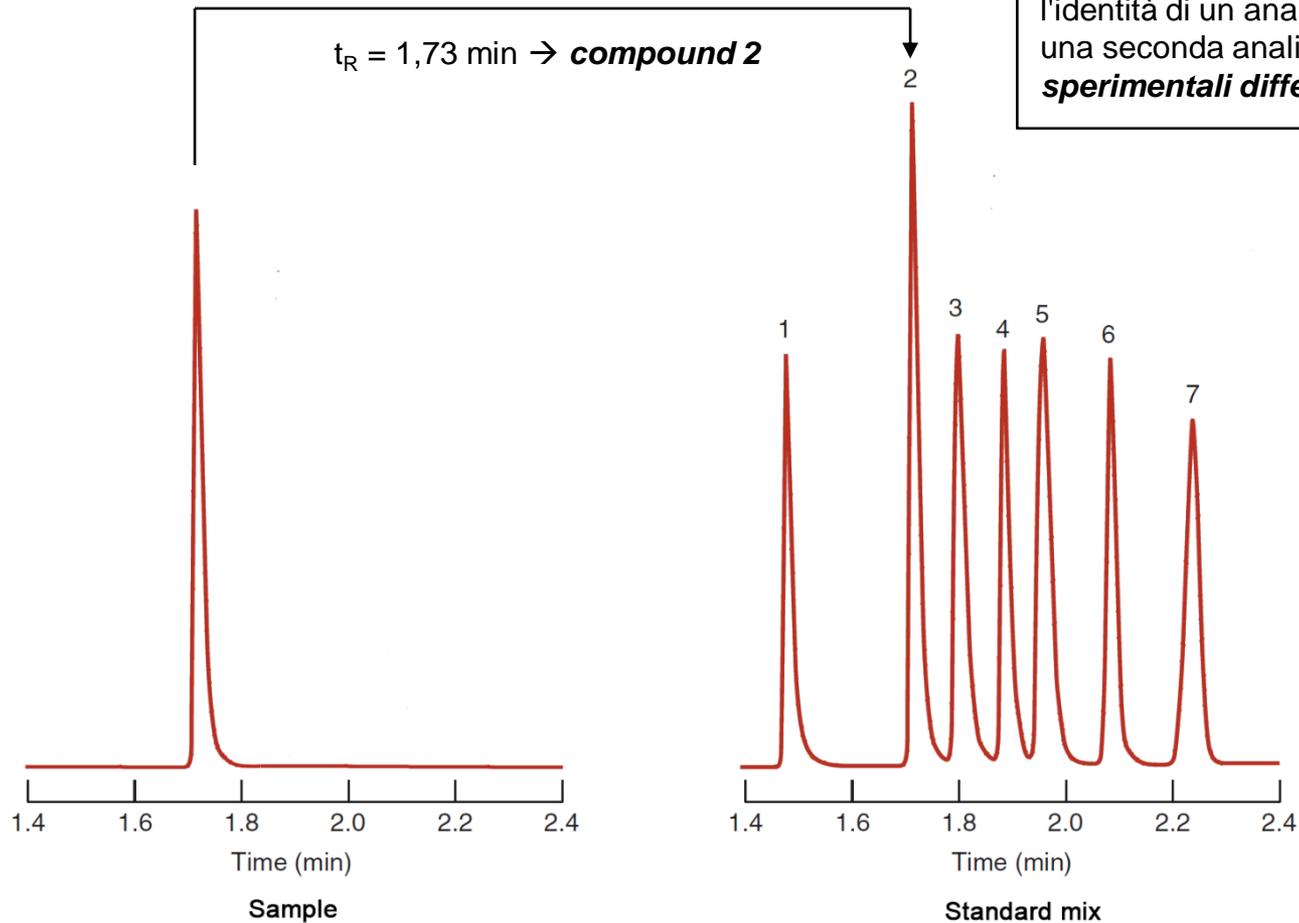
Il **tempo morto** ( $t_M$ ) è il tempo impiegato dalla fase mobile per percorrere la colonna. Corrisponde al picco iniziale del cromatogramma, dovuto ad analiti contenuti nel campione ma non trattenuti dalla colonna.

Il tempo di ritenzione è quindi la somma del tempo di ritenzione corretto (il tempo trascorso dall'analita **legato alla fase stazionaria**) e del tempo morto (il tempo trascorso dall'analita **nella fase mobile**).



Nel confronto dei cromatogrammi si assume che picchi cromatografici con lo stesso tempo di ritenzione siano **dovuti allo stesso analita**.

Una coincidenza casuale dei tempi di ritenzione è sempre possibile. In assenza di altre informazioni l'identità di un analita può essere confermata da una seconda analisi effettuata in **condizioni sperimentali differenti**.



# CROMATOGRAFIA

## ANALISI QUALITATIVA E QUANTITATIVA

Un altro parametro spesso utilizzato per descrivere la ritenzione degli analiti è il **fattore di ritenzione ( $k$ )**.

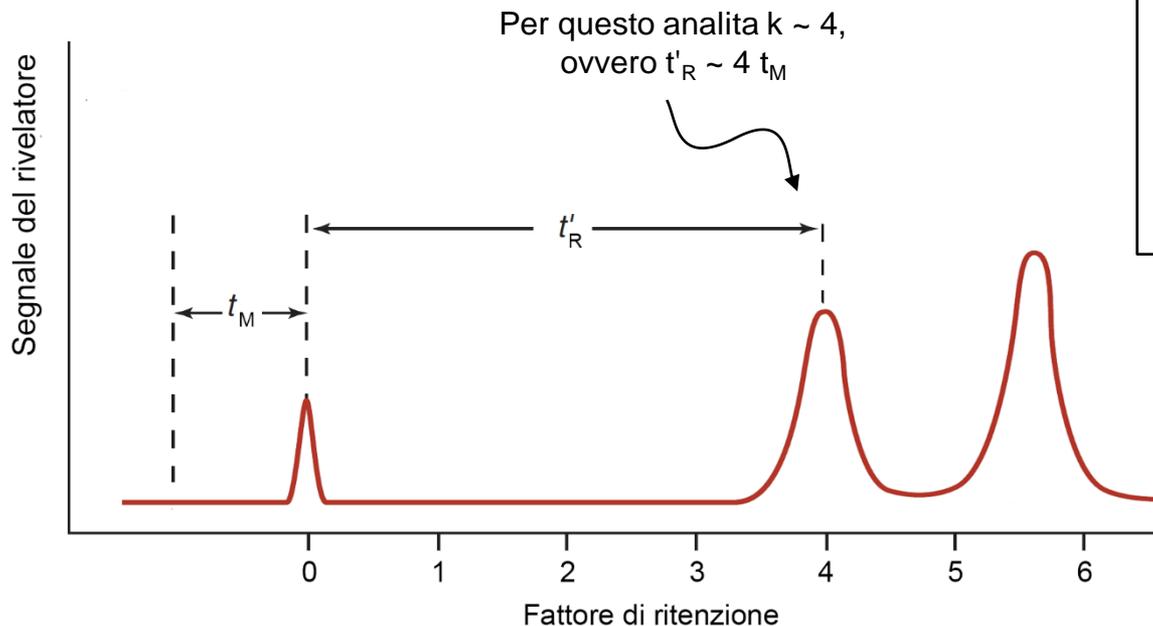
$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M} = \frac{t'_R}{t_M}$$

Il fattore di ritenzione (a differenza dei tempi di ritenzione) **non dipende dalla velocità della fase mobile**.

Permette anche di determinare  $K_D$  poiché considerazioni basate sulla velocità di migrazione portano alla relazione

$$k = \frac{\text{moli analita}_{\text{fase stazionaria}}}{\text{moli analita}_{\text{fase mobile}}} = \frac{[\text{analita}]_{\text{fase stazionaria}} V_S}{[\text{analita}]_{\text{fase mobile}} V_M} = K_D \frac{V_S}{V_M}$$

( $V_S/V_M$  è un parametro caratteristico della colonna cromatografica).



### ***Come si effettua una analisi quantitativa?***

L'analisi quantitativa è basata sulla misura delle **aree dei picchi cromatografici** e sull'impiego di curve di calibrazione ottenute analizzando soluzioni standard di analita.

L'area di un picco cromatografico è **proporzionale alla quantità di analita**. Siccome la risposta del rivelatore dipende dalla natura dell'analita è necessario generare una curva di calibrazione per ogni analita da determinare.

#### ***Calibrazione mediante standard esterno***

#### ***Calibrazione mediante standard interno***

Questo tipo di calibrazione viene usato per ridurre errori legati alla non riproducibilità della iniezione del campione (es. in gascromatografia) o a recupero non completo nei trattamenti preanalitici.

Per potere effettuare l'analisi il picco cromatografico dello standard interno utilizzato deve cadere in una zona del cromatogramma **priva di altri analiti**.

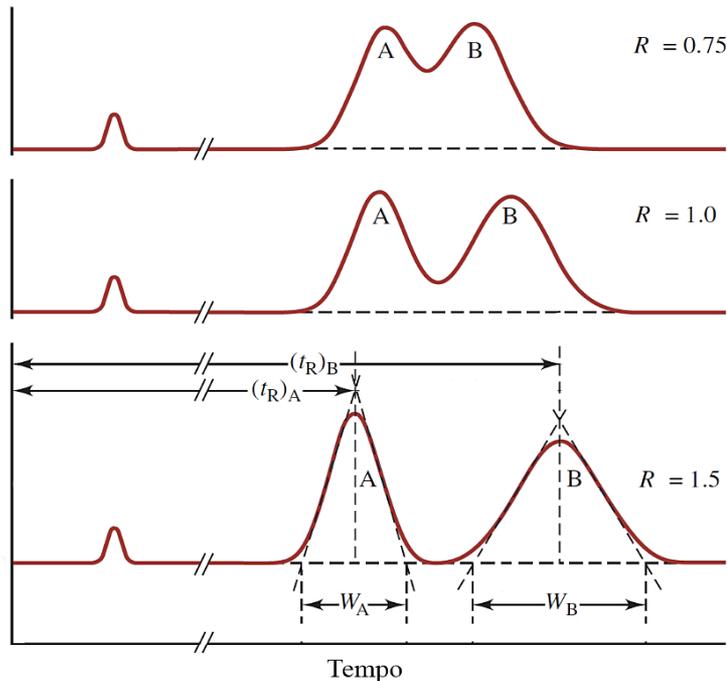
## EFFICIENZA DI UNA SEPARAZIONE CROMATOGRAFICA

**Come si valutano le prestazioni di un sistema cromatografico?**

Per una analisi corretta è necessario ottenere **picchi cromatografici separati** (ovvero la separazione cromatografica deve essere selettiva).

Una analisi può essere effettuata anche su picchi sovrapposti ma gli errori aumentano con l'entità delle sovrapposizioni.

La separazione di due picchi cromatografici viene definita attraverso la **risoluzione (R)**.



$$R = \frac{(t_R)_B - (t_R)_A}{\frac{W_B}{2} + \frac{W_A}{2}}$$

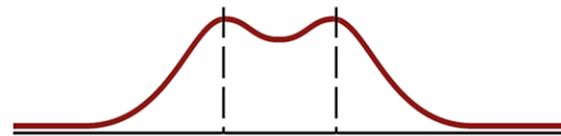
La risoluzione è legata alla **differenza fra i tempi di ritenzione** e alla **larghezza dei picchi cromatografici**.

Una separazione è **considerata quantitativa** se  $R \geq 1,5$  (la sovrapposizione dei picchi è inferiore allo 0,3%).

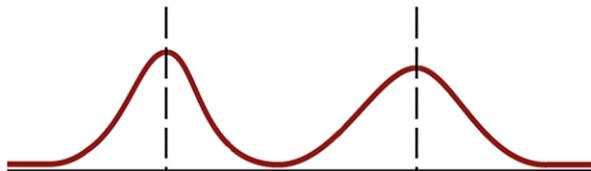
# EFFICIENZA DI UNA SEPARAZIONE CROMATOGRAFICA

## *Come si può migliorare una separazione?*

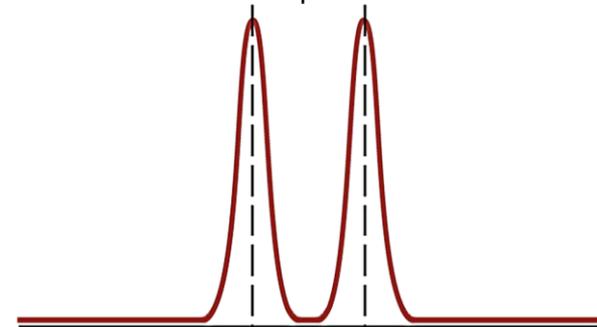
La risoluzione dipende da due processi contrapposti, la **migrazione a differente velocità** degli analiti e l'**allargamento delle bande cromatografiche** durante la separazione, e può essere migliorata agendo sui fattori che influenzano questi processi.



Picchi cromatografici non separati



Miglioramento della separazione ottenuto agendo sulla **velocità di migrazione degli analiti** (ovvero sui tempi di ritenzione)



Miglioramento della separazione ottenuto agendo sulla **larghezza dei picchi cromatografici**

## EFFICIENZA DI UNA SEPARAZIONE CROMATOGRAFICA

**Come si modifica la separazione dei picchi?**

La differenza fra i tempi di ritenzione di due analiti dipende dalla selettività della separazione, definita dal **fattore di selettività**  $\alpha_{B/A}$ .

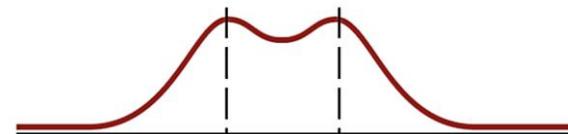
$$\alpha_{B/A} = \frac{(t'_R)_B}{(t'_R)_A} = \frac{(K_D)_B}{(K_D)_A}$$

Per convenzione B è l'analita con il tempo di ritenzione maggiore, quindi  $\alpha_{B/A} > 1$ .

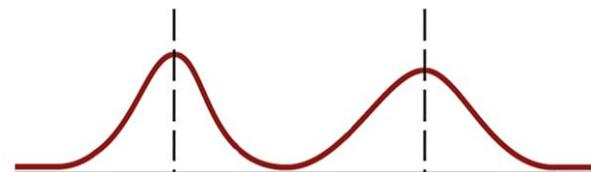
La selettività può essere migliorata differenziando le costanti di distribuzione degli analiti.

**Fase stazionaria più selettiva****Diverse condizioni di separazione**

Alcuni parametri (es. fase mobile, pH) possono influenzare le costanti di distribuzione in modo diverso per i due analiti.



Miglioramento della selettività



La separazione dei picchi cromatografici dipende dal rapporto fra le costanti di distribuzione.

# EFFICIENZA DI UNA SEPARAZIONE CROMATOGRAFICA

## *Come si modifica la larghezza dei picchi?*

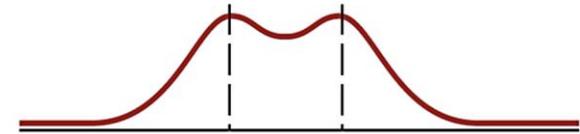
La larghezza dei picchi cromatografici dipende dalla **efficienza della colonna cromatografica**.

L'efficienza può essere migliorata agendo sul sistema cromatografico.

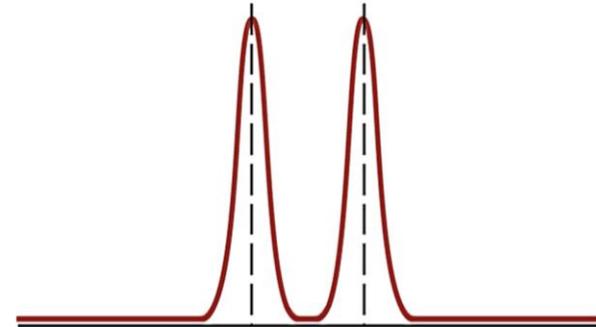
**Colonne più efficienti**

**Condizioni di separazione ottimali**

Alcuni parametri (es. velocità di flusso della fase mobile) influenzano l'efficienza della colonna cromatografica.



Miglioramento  
della efficienza



La larghezza dei picchi cromatografici è inversamente proporzionale all'efficienza.

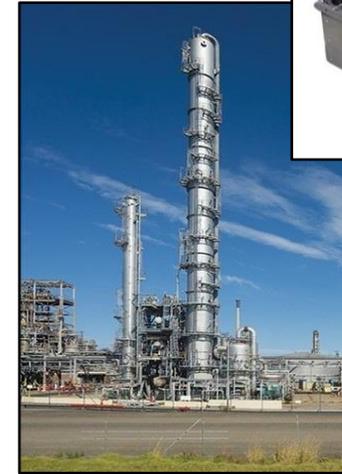
# EFFICIENZA DI UNA SEPARAZIONE CROMATOGRAFICA

## Come si definisce l'efficienza di una colonna cromatografica?

L'efficienza di una colonna è legata al **numero di piatti teorici (N)**.

Un piatto teorico è il segmento di colonna dove si instaura l'equilibrio dell'analita fra la fase mobile e quella stazionaria. Maggiori sono i piatti teorici (e quindi gli stadi di equilibrio), più stretti sono i picchi cromatografici.

In una **colonna industriale per distillazione frazionata** i piatti sono elementi fisici dove si instaura l'equilibrio fra la fase vapore e la fase liquida.



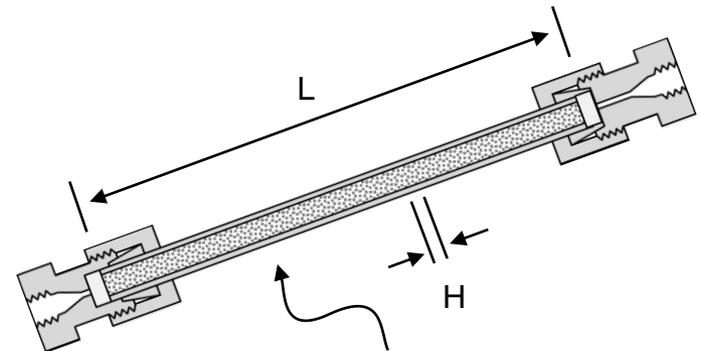
Colonna industriale di distillazione frazionata e piatto interno della colonna

Numero di piatti teorici, altezza del piatto teorico (H) e lunghezza della colonna (L) sono legati dalla

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

Colonna di distillazione industriale:

<https://www.youtube.com/watch?v=6Zqe-rHf2v0>



In una colonna cromatografica non esistono piatti "fisici" (la fase stazionaria è distribuita in modo omogeneo)

# EFFICIENZA DI UNA SEPARAZIONE CROMATOGRAFICA

## Come si ricava il numero di piatti teorici?

Un piatto teorico è un **entità virtuale**, pertanto il numero di piatti teorici di una colonna può essere solo indirettamente dalle caratteristiche dei picchi cromatografici.

Ad esempio, N è legato ai parametri di un picco cromatografico dalla relazione

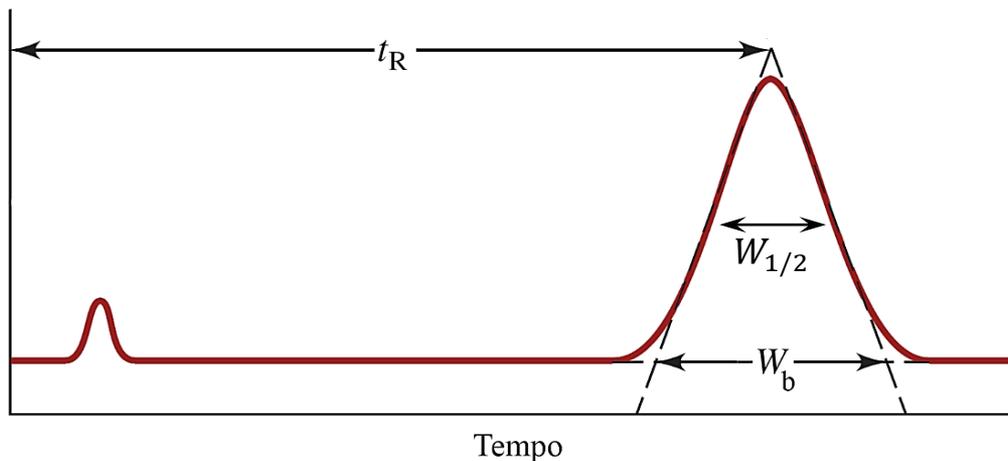
$$N = 16 \left( \frac{t_R}{W_b} \right)^2$$

Un'altra relazione spesso utilizzata ( $W_{1/2}$  è più facile da misurare di  $W_b$ ) è la

$$N = 5,54 \left( \frac{t_R}{W_{1/2}} \right)^2$$

( $t_R$  e larghezza del picco devono essere espressi nelle **stesse unità di misura**).

In pratica il calcolo di N viene fatto su vari analiti con tempi di ritenzione differenti e si calcola la media dei valori di N ottenuti.



## TEORIA DELLA SEPARAZIONE CROMATOGRAFICA

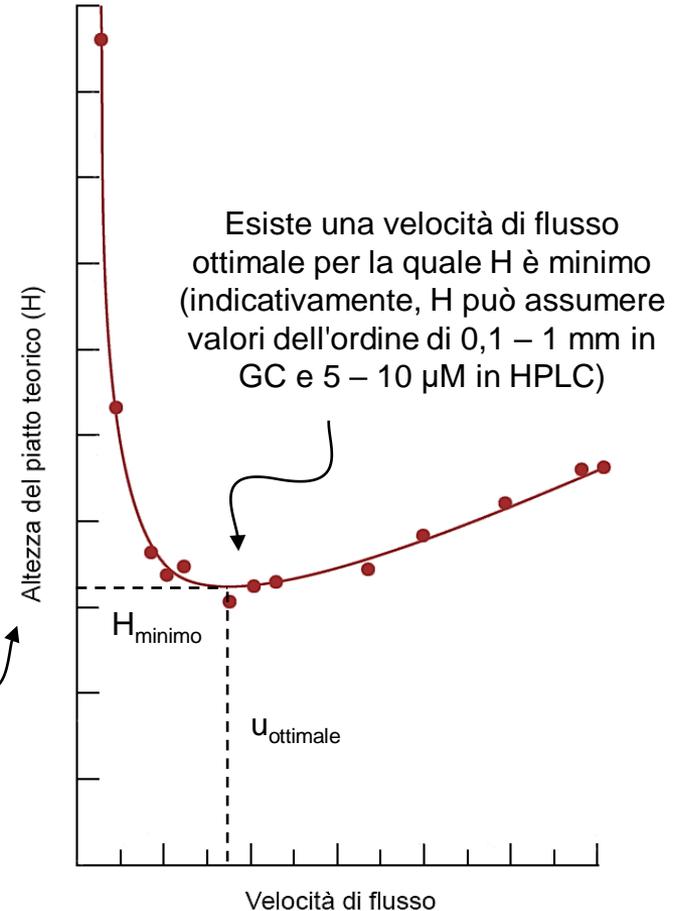
**Che cosa determina l'efficienza di una colonna?**

L'efficienza di una colonna cromatografica dipende dalle **caratteristiche della colonna** e dalla **velocità di flusso** della fase mobile.

Questa dipendenza è descritta dalla **teoria della velocità**, che considera i processi che causano l'allargamento di una banda cromatografica.

Questa teoria descrive **processi di separazione ideali**, che producono picchi con andamento gaussiano (picchi asimmetrici indicano fenomeni non ideali durante il processo di separazione).

Per consuetudine si studia l'effetto della velocità di flusso della fase mobile sulla altezza del piatto teorico (**valori più bassi** di H corrispondono a **efficienze maggiori** per una colonna)



Dipendenza dell'efficienza di una colonna cromatografica dalla velocità della fase mobile

# TEORIA DELLA SEPARAZIONE CROMATOGRAFICA

La relazione fra altezza del piatto teorico e velocità di flusso della fase mobile ( $u$ ) è descritta dalla **equazione di Van Deemter**.

$$H = A + \frac{B}{u} + (C_s + C_m)u$$

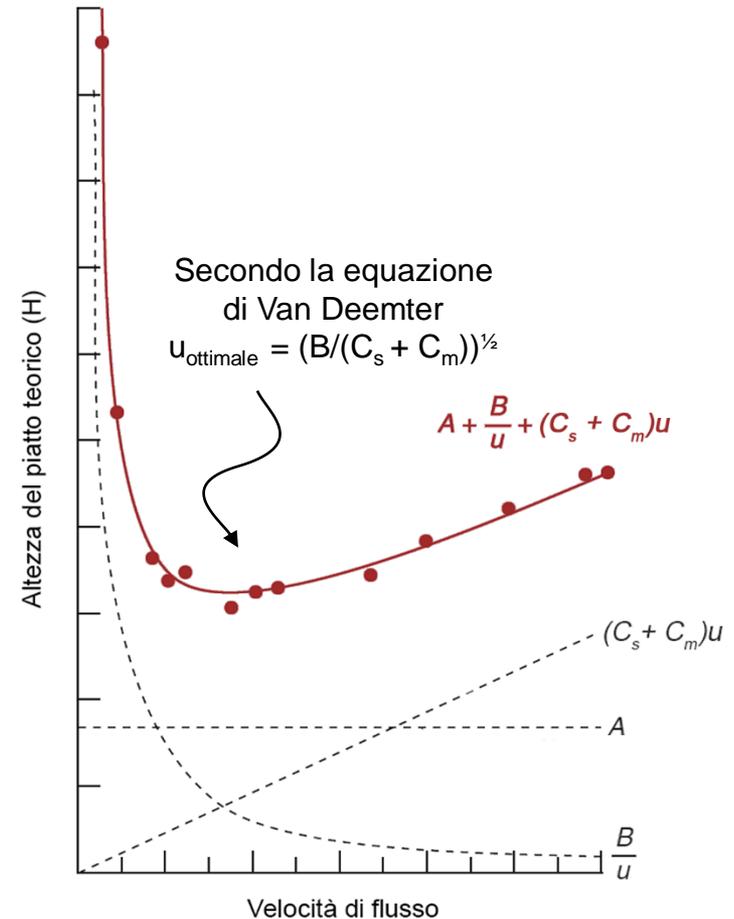
Questa equazione è generica (ne esistono di più complesse) ed i termini effettivamente presenti dipendono dal tipo di cromatografia e dalle caratteristiche della colonna.

I coefficienti sono associati ai diversi fenomeni che contribuiscono alla altezza del piatto teorico.

**Percorsi multipli (A)**

**Diffusione longitudinale (B)**

**Trasferimento di massa (C)**



Componenti che contribuiscono all'altezza del piatto teorico nella equazione di Van Deemter

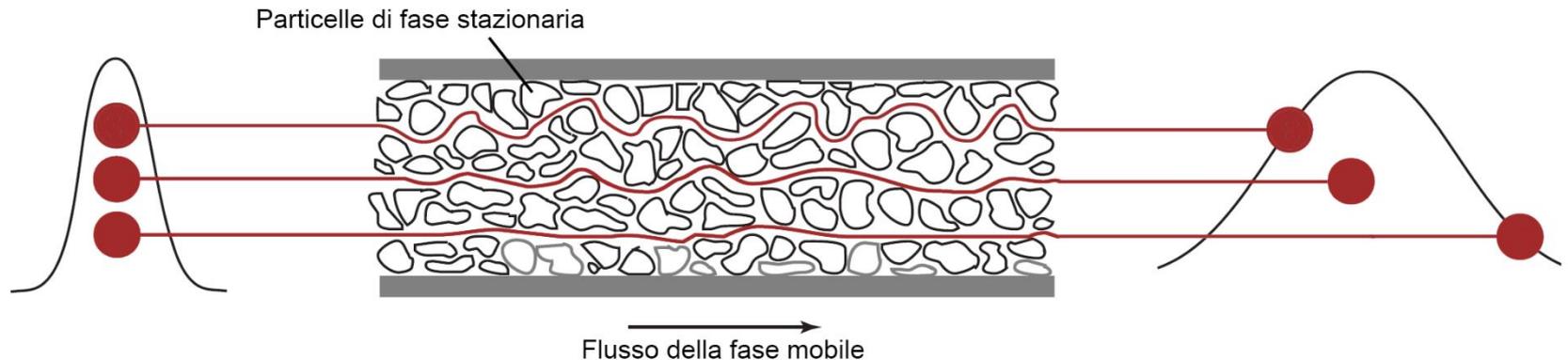
# TEORIA DELLA SEPARAZIONE CROMATOGRAFICA

## **Allargamento di banda dovuto ai percorsi multipli**

Attraversando la fase stazionaria la fase mobile **percorre cammini diversi**, pertanto l'analita giunge in tempi differenti all'uscita della colonna.

In prima approssimazione l'allargamento di banda **non dipende** dalla velocità di flusso poiché i percorsi sono fissi.

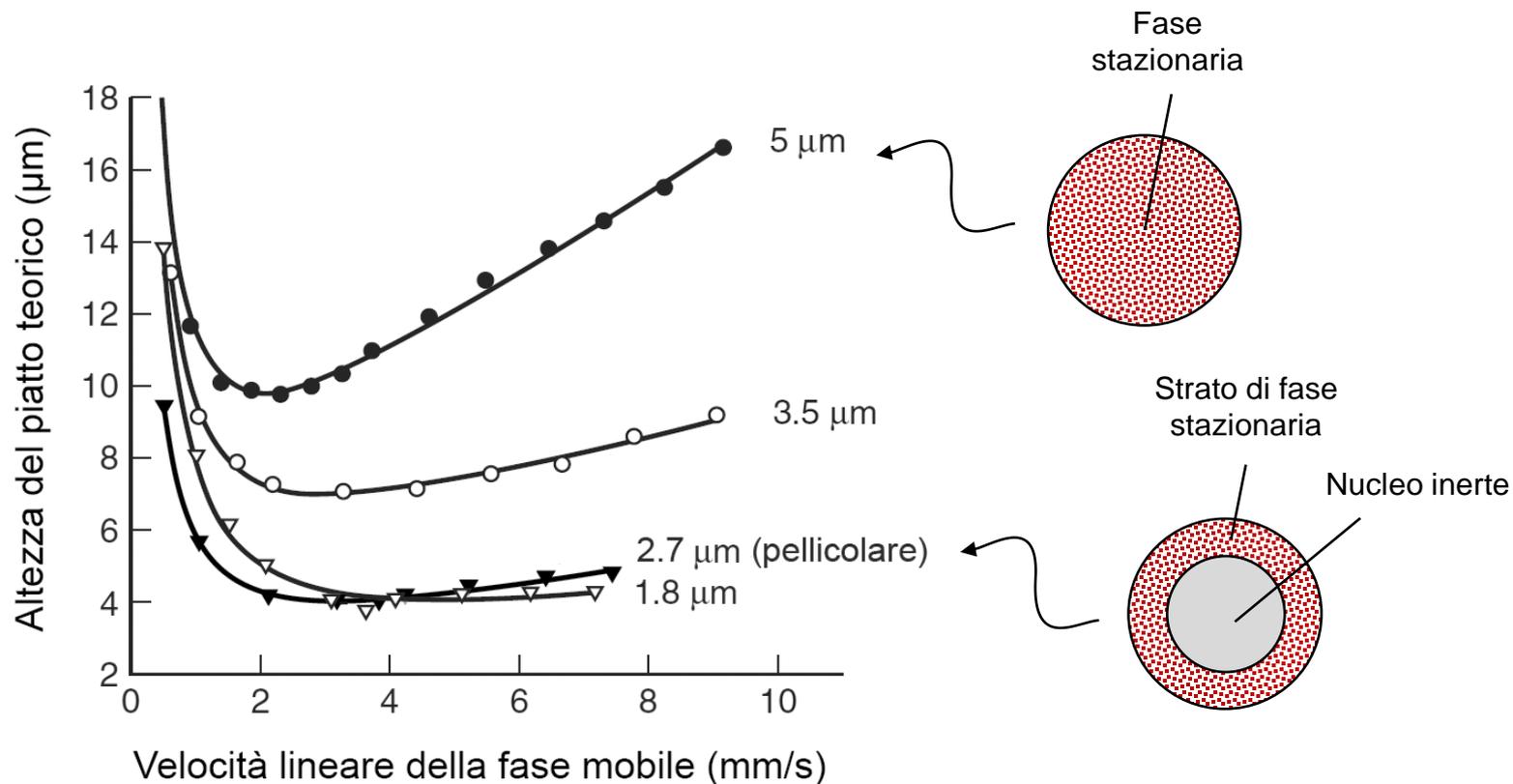
Questo contributo è tipico delle **colonne cromatografiche impaccate** (con particelle di fase stazionaria che riempiono la colonna) ma non è presente in quelle capillari (vuote internamente).



Questo fenomeno può essere ridotto **diminuendo le dimensioni delle particelle** di fase stazionaria. Ciò però causa (specialmente in cromatografia liquida) un aumento della la pressione necessaria per ottenere il flusso della fase mobile (in HPLC si usano pressioni di 100 - 200 atm, in UPLC di 1000 atm e oltre).

## TEORIA DELLA SEPARAZIONE CROMATOGRAFICA

*Effetto delle dimensioni delle particelle sull'altezza del piatto teorico in cromatografia liquida*



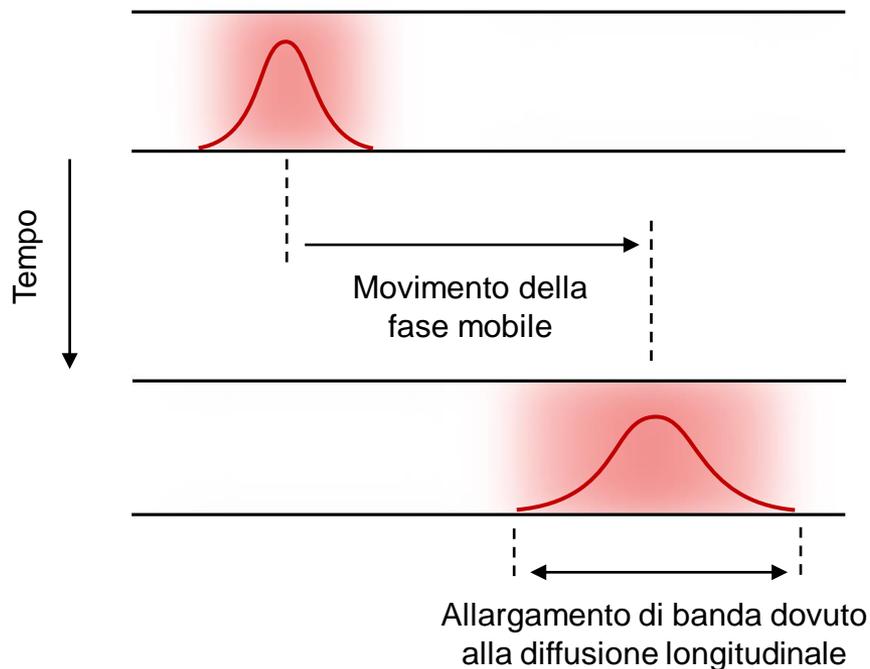
Le minori altezze ottenute con la fase stazionaria pellicolare derivano da un minore coefficiente di trasferimento di massa nella fase stazionaria ( $C_s$ ).

# TEORIA DELLA SEPARAZIONE CROMATOGRAFICA

## *Allargamento di banda dovuto alla diffusione longitudinale*

Nella colonna cromatografica l'analita **diffonde spontaneamente** dalle zone ad elevata concentrazione (le bande cromatografiche) alle zone a concentrazione inferiore.

La **dipendenza inversa** dalla velocità di flusso dipende dal fatto che a flussi più elevati i tempi di ritenzione sono inferiori, quindi il processo ha meno tempo per verificarsi.



L'allargamento di banda dipende dal coefficiente di diffusione dell'analita, legato a massa molecolare, temperatura ma soprattutto allo **stato fisico** dell'analita. Questo fenomeno è importante in **gascomatografia** perché i coefficienti di diffusione degli analiti in fase gassosa sono 1000 – 10000 volte più grandi che in soluzione.

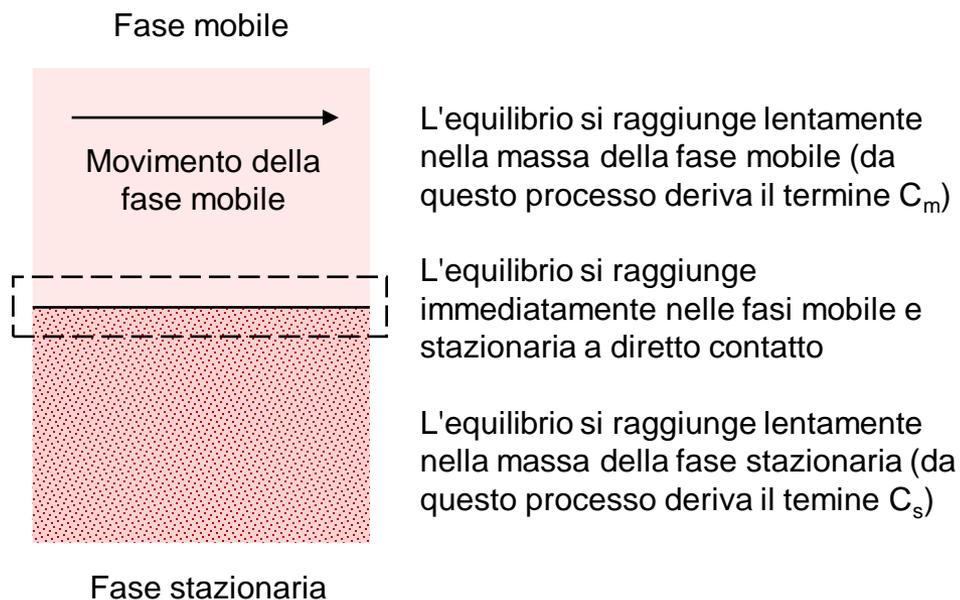
## TEORIA DELLA SEPARAZIONE CROMATOGRAFICA

**Allargamento di banda dovuto al trasferimento di massa**

L'equilibrio dell'analita fra le fasi mobile e stazionaria **non si instaura istantaneamente** (l'analita deve diffondere all'interno delle due fasi per uniformare le concentrazioni).

La **dipendenza diretta** dalla velocità di flusso è dovuta al fatto che per basse velocità di flusso i tempi di ritenzione sono maggiori e l'equilibrio ha più tempo per stabilirsi.

Spesso si considerano separatamente i contributi legati al trasferimento di massa all'interno della fase stazionaria ( $C_s$ ) e della fase mobile ( $C_m$ ).



Questo fenomeno può essere ridotto **diminuendo lo spessore della fase stazionaria** (es. usando film di fase stazionaria più sottili, particelle più piccole o particelle di fase stazionaria pellicolari) e **miscelando efficacemente la fase mobile** (es. operando in regime di moto turbolento).

# OTTIMIZZAZIONE DI UNA SEPARAZIONE CROMATOGRAFICA

## Come si ottimizza una separazione cromatografica?

L'ottimizzazione di una separazione cromatografica punta ad individuare le condizioni adatte per ottenere una **adeguata separazione** degli analiti **in un tempo ragionevole**.

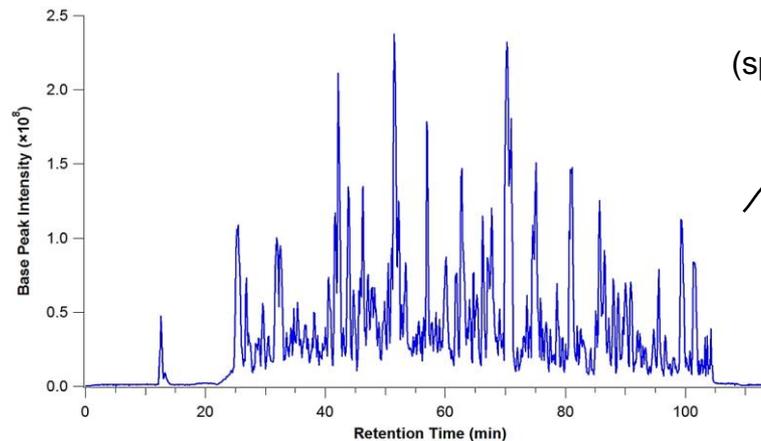
Una separazione può essere sempre migliorata usando una colonna più lunga (la risoluzione cresce con  $L^{1/2}$ ) ma i tempi di ritenzione aumentano proporzionalmente a  $L$ .

### Colonna cromatografica

Natura della fase stazionaria e lunghezza della colonna influenzano efficienza e selettività

### Fattore di ritenzione

Fattori di ritenzione troppo alti (spesso si sconsigliano valori oltre 10) allungano i tempi di analisi



### Parametri sperimentali

Velocità di flusso, temperatura (GC) e composizione della fase mobile (HPLC) influenzano efficienza della colonna e ritenzione degli analiti

### Modalità di eluizione

Separazioni a temperatura programmata (GC) o in gradiente di composizione di fase mobile (HPLC) permettono di analizzare rapidamente miscele complesse con caratteristiche diverse

Le tecniche gascromatografiche sono impiegate per l'analisi di composti allo stato gassoso (gas o specie volatili portate allo stato gassoso).

Sono classificate in base alle **caratteristiche della fase stazionaria** e ai **processi responsabili della ritenzione** degli analiti.

Per ovvie ragioni le tecniche GC sono tecniche **in colonna**.

**Adsorbimento**

Separazione di specie gassose

**Ripartizione**

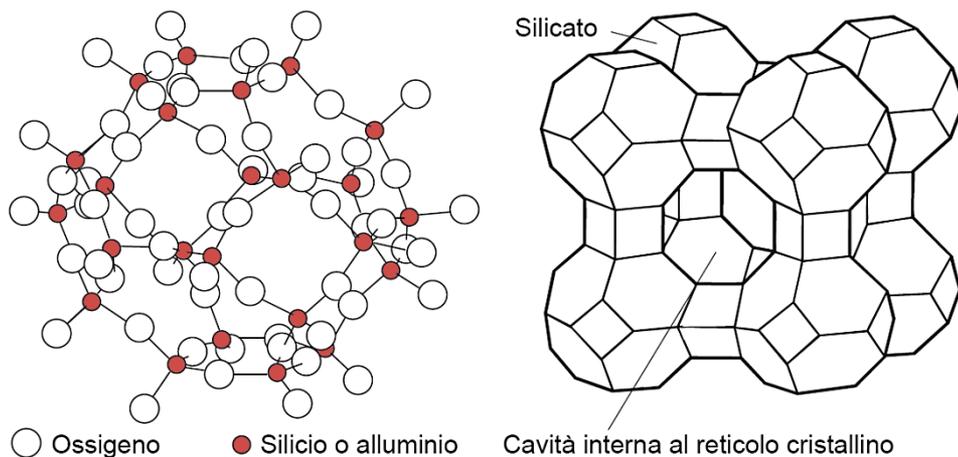
Separazione di specie liquide o solide, ma volatili (generalmente di natura organica)

### ***Gas Cromatografia di adsorbimento (gas cromatografia gas-solido)***

La fase stazionaria è un **materiale poroso** (es. carbone, setacci molecolari) con elevata area superficiale (fino a  $1000 \text{ m}^2/\text{g}$ ) e pori di dimensioni simili alle molecole degli analiti (tipicamente  $3 - 10 \text{ \AA}$ ).

La separazione dipende principalmente dall'adsorbimento degli analiti sui siti attivi della fase stazionaria grazie a vari tipi di interazioni (es. forze di van der Waals, legami dipolari o a idrogeno).

Possono esistere anche fattori legati alle **dimensioni molecolari** (per un analita troppo grande per entrare nei pori il volume apparente del materiale adsorbente è inferiore).



Struttura di un setaccio molecolare sintetico (zeolite) impiegato come fase stazionaria in GC



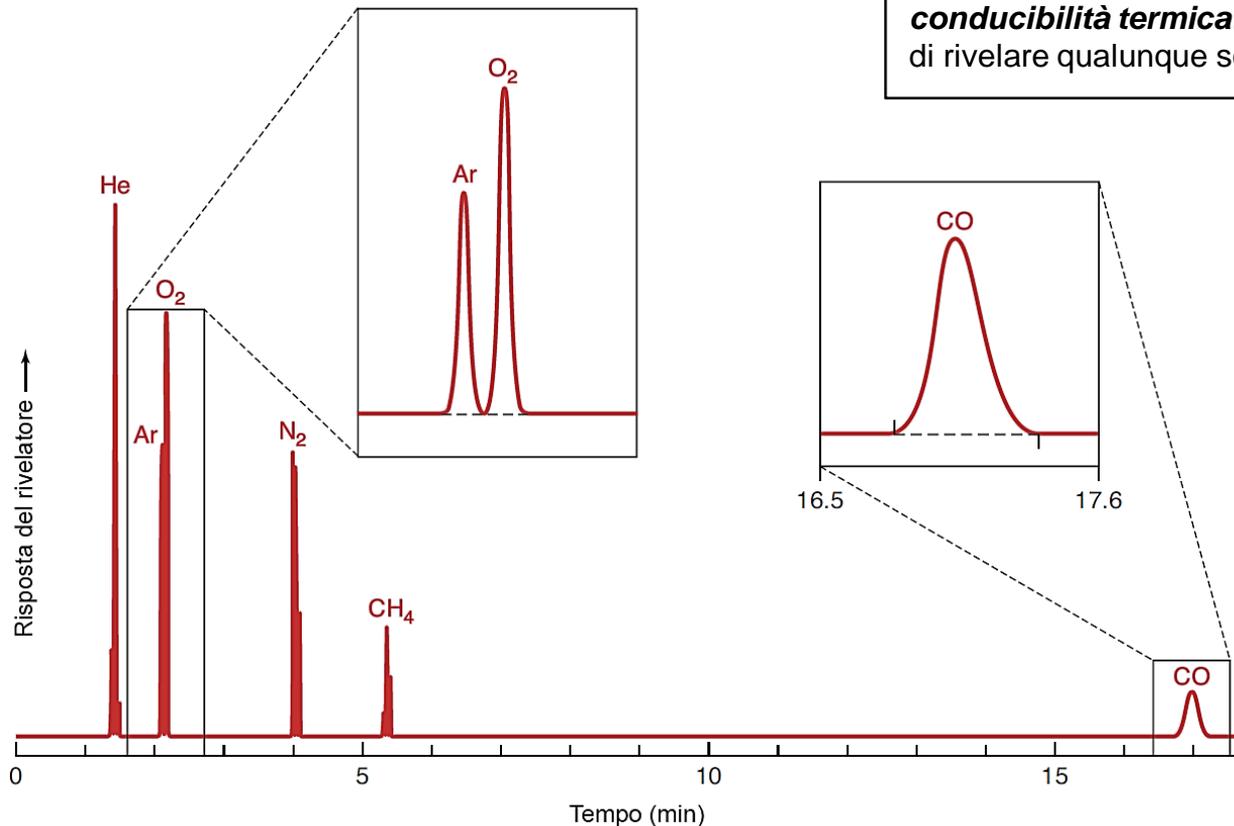
Setacci molecolari sintetici

# CROMATOGRAFIA

## GASCROMATOGRAFIA

La gascromatografia di adsorbimento viene in genere utilizzata per **gas permanenti** (composti allo stato gassoso in condizioni normali, es. CO, NO<sub>x</sub>, SO<sub>x</sub>, composti organici a basso peso molecolare).

Queste caratteristiche la rendono adatta per l'analisi di inquinanti atmosferici. Spesso si impiegano **rivelatori a conducibilità termica**, non molto sensibili ma in grado di rivelare qualunque sostanza organica o inorganica.



Separazione di analiti gassosi mediante gascromatografia gas-solido

***Gas Cromatografia di ripartizione (gas cromatografia gas-liquido)***

La fase stazionaria è generalmente un **polimero** in grado di agire come solvente nei confronti degli analiti.

Date le alte temperature usate in questo tipo di GC (anche 150 – 200°C) per la fase stazionaria sono fondamentali **stabilità termica** e **inerzia chimica** verso gli analiti.

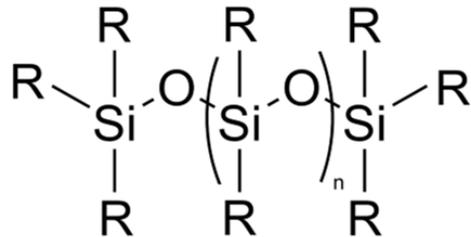
La separazione si basa sul processo di **ripartizione** degli analiti fra la fase mobile e la fase stazionaria. Tale processo dipende principalmente dalla polarità degli analiti, pertanto in gas cromatografia gas-liquido vengono usate fasi stazionarie con **polarità simili** a quelle degli analiti da separare.

Con analiti molto polari conviene però evitare colonne ad elevata polarità (le interazioni molto forti porterebbero a lunghi tempi di ritenzione).

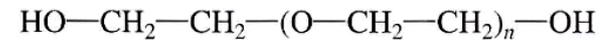
# CROMATOGRAFIA

## GASCROMATOGRAFIA

Le principali fasi stazionarie polimeriche usate in gascromatografia gas-liquido sono i **polisilossani**, polimeri siliconici disponibili in una ampia gamma di polarità (la polarità varia in base alla natura dei gruppi nelle catene laterali).



Per analiti polari sono usate anche fasi stazionarie a base di di **glicole polietilenico**.



Gruppi laterali a polarità crescente	Stationary Phase	Maximum Temperature, °C	Common Applications
R = -CH <sub>3</sub>	Polydimethyl siloxane	350	General-purpose nonpolar phase, hydrocarbons, polynuclear aromatics, steroids, PCBs
R = -C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	5% Phenyl-polydimethyl siloxane	350	Fatty acid methyl esters, alkaloids, drugs, halogenated compounds
R = -C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> CF <sub>3</sub>	50% Phenyl-polydimethyl siloxane	250	Drugs, steroids, pesticides, glycols
R = -CN	50% Trifluoropropyl-polydimethyl siloxane	200	Chlorinated aromatics, nitroaromatics, alkyl substituted benzenes
	50% Cyanopropyl-polydimethyl siloxane	240	Polyunsaturated fatty acids, rosin acids, free acids, alcohols

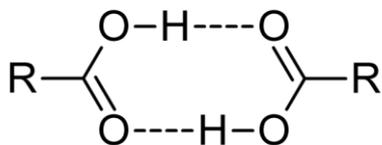
# CROMATOGRAFIA

## GASCROMATOGRAFIA

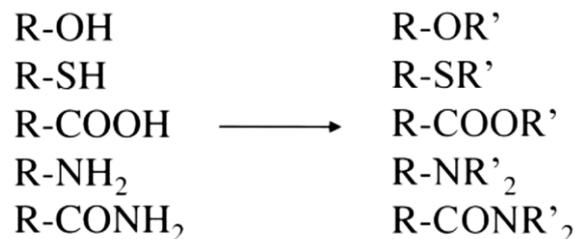
La gascromatografia gas-liquido viene prevalentemente usata per composti organici liquidi o solidi **volatili** e **termostabili**, che possono quindi essere portati allo stato gassoso per riscaldamento.

I composti liquidi possono essere analizzati come tali, mentre quelli solidi (ed liquidi se necessitano di diluizione) devono essere disciolti in un adatto solvente volatile.

Composti poco volatili a causa di forti legami intermolecolari (es. alcoli ed acidi organici) possono essere analizzati per gascromatografia solo dopo **derivatizzazione chimica** per ridurre il punto di ebollizione.



Legami ad idrogeno fra molecole di un acido carbossilico



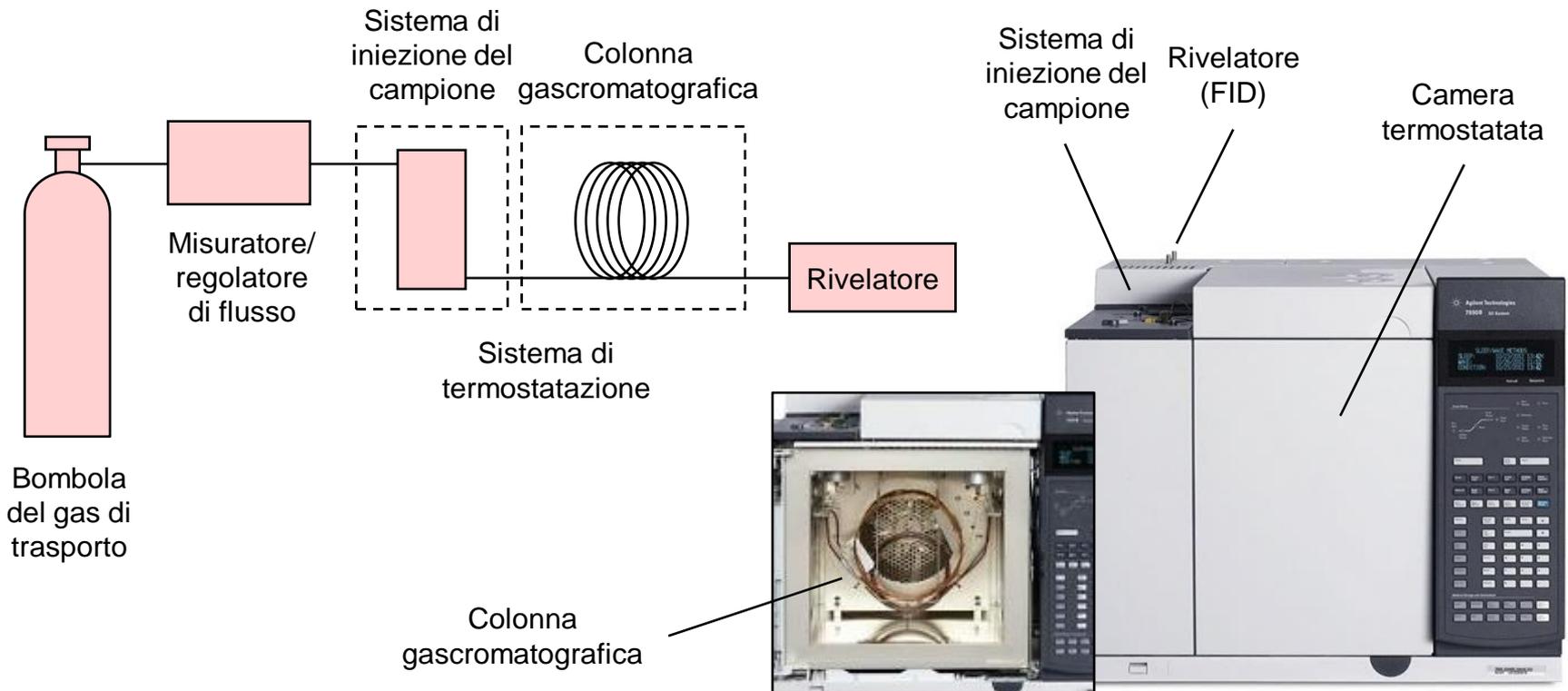
Una reazione di alchilazione permette di ridurre la polarità di un analita sostituendo un idrogeno in grado di formare ponti ad idrogeno con un gruppo alchilico

# CROMATOGRAFIA

## GASCROMATOGRAFIA

### *Come è fatto un sistema per gascromatografia?*

Nelle comuni tecniche gascromatografiche il campione viene inserito in una **camera di iniezione** dove viene vaporizzato e quindi trascinato dalla fase mobile gassosa in una **colonna gascromatografica** termostata dove i componenti si separano in base alla loro affinità con la fase stazionaria. I componenti separati vengono infine rivelati da un **rivelatore** posto all'uscita della colonna.



## ***Gas di trasporto***

In gascromatografia la fase mobile ***non interagisce con gli analiti*** ma ha solo il compito di trasportarli lungo la colonna cromatografica.

Il flusso di fase mobile viene controllato dalla ***pressione in ingresso*** nella colonna. I flussi variano da 20 - 150 mL/min (colonne impaccate) a 1 - 10 mL/min (colonne capillari).

Come fase mobile si impiegano in genere gas nobili (***elio, argon***) che garantiscono elevata inerzia chimica nei confronti degli analiti e della fase stazionaria (sono talvolta usati anche altri gas, es. azoto).

Poiché la fase mobile deve solo trasportare gli analiti, la sua scelta è dettata solo da criteri strumentali (es. rivelatori richiedono elio) o economici (l'elio è più costoso dell'argon). Se si deve usare ***idrogeno*** (es. come combustibile in un rivelatore FID) per ragioni di sicurezza questo gas viene ottenuto non da bombole ma da generatori che lo producono sfruttando l'elettrolisi dell'acqua.

# CROMATOGRAFIA

## GASCROMATOGRAFIA

### *Iniezione del campione*

Il campione viene iniettato nella camera di iniezione usando **microsiringhe**. Il controllo della quantità di campione iniettato (specialmente nel caricamento manuale) non è perfetto e per analisi quantitative accurate si utilizza spesso uno standard interno.

I volumi delle microsiringhe sono dell'ordine di 1 – 100  $\mu\text{L}$  per campioni liquidi (i campioni solidi possono essere disciolti in un solvente volatile) ma possono andare fino a qualche mL per campioni gassosi.



Microsiringhe per l'iniezione di campioni liquidi



Microsiringhe per l'iniezione di campioni gassosi

# CROMATOGRAFIA

## GASCROMATOGRAFIA

Per migliorare la riproducibilità della iniezione del campione ed automatizzare la procedura di analisi in gascromatografia (ma anche in HPLC) è possibile utilizzare **autocampionatori**.

Un autocampionatore può consistere semplicemente in una microsiringa automatizzata o utilizzare sistemi più sofisticati (es. iniezione attraverso un loop) rimpiazzando completamente il normale sistema di iniezione del gascromatografo.



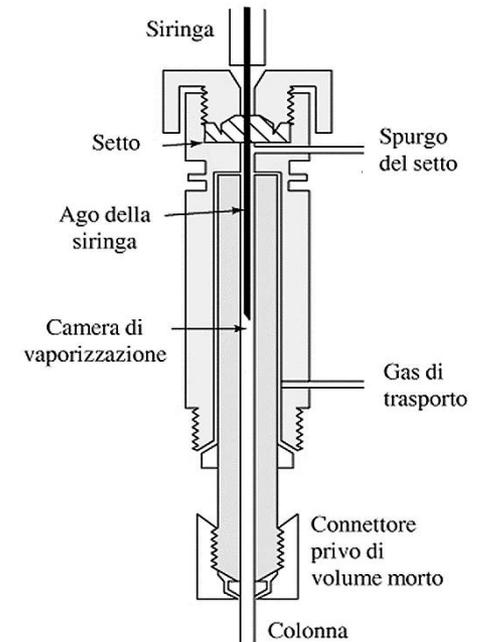
Autocampionatore per GC basato su microsiringa

# CROMATOGRAFIA

## GASCROMATOGRAFIA

L'iniezione di campioni liquidi (i campioni gassosi possono essere iniettati direttamente in colonna) avviene in una **camera di iniezione** riscaldata dove scorre il gas di trasporto.

La camera di iniezione **vaporizza istantaneamente** gli analiti e l'eventuale solvente in modo che entrino nella colonna in fase gassosa. Per questo motivo la camera è mantenuta ad una temperatura elevata (almeno 50°C superiore a quella di ebollizione degli analiti contenuti nel campione).



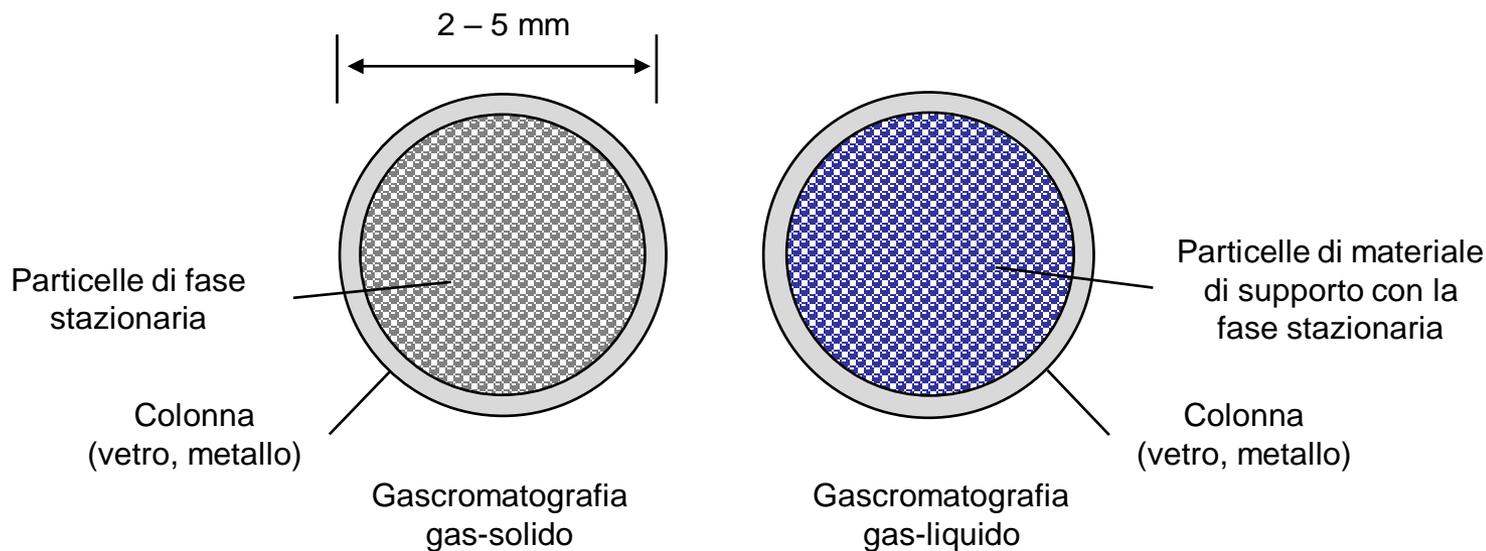
Iniezione manuale del campione in GC:  
<https://www.youtube.com/watch?v=xelz9qbi0T8>

Camera di iniezione di un gascromatografo

***Colonne per gascromatografia***

Le **colonne impaccate** hanno diametri relativamente grandi (2 - 4 mm) e lunghezze ridotte (1 - 2 metri). Contengono particelle di fase stazionaria solida (gascromatografia gas-solido) o di materiale di supporto per la fase stazionaria (gascromatografia gas-liquido). Le dimensioni delle particelle (100 - 250  $\mu\text{m}$ ) sono un compromesso tra efficienza (migliore per particelle più piccole) e pressione necessaria per ottenere il flusso della fase mobile (minore per particelle più grandi).

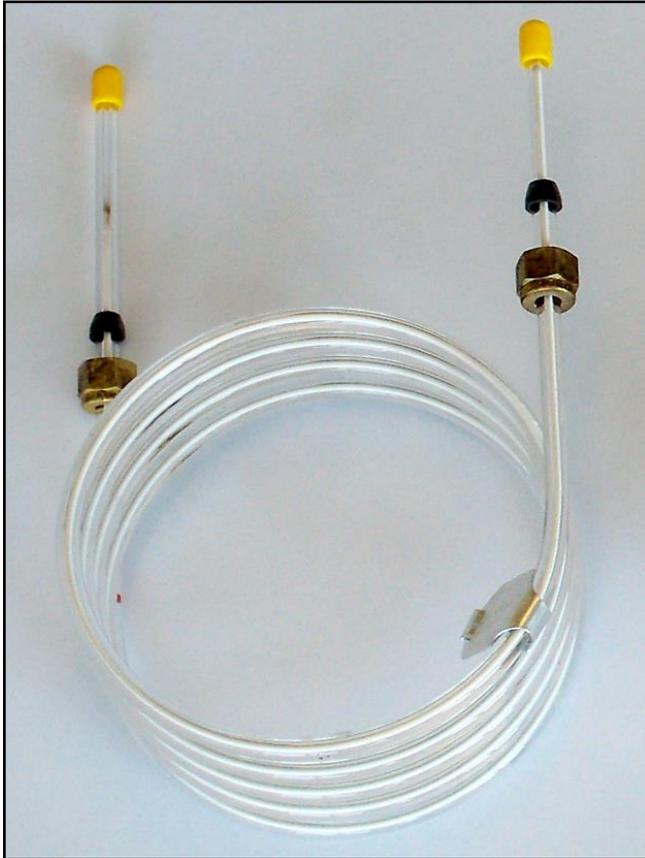
Hanno comunque **bassa efficienza** e sono utilizzate solo per le separazioni più semplici.



# CROMATOGRAFIA

## GASCROMATOGRAFIA

### *Colonne impaccate per gascromatografia*



Colonna impaccata con tubo in vetro



Le colonne impaccate per gascromatografia sono relativamente corte ma devono comunque essere avvolte a spirale per essere contenute nel forno termostato

Colonna impaccata con tubo in acciaio inossidabile

# CROMATOGRAFIA

## GASCROMATOGRAFIA

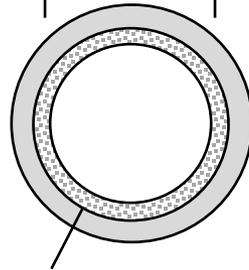
Le **colonne tubolari aperte** sono più sottili (diametro dell'ordine del millimetro o meno) e più lunghe (fino a 20 - 50 metri). Sono disponibili in versioni per gascromatografia gas-liquido e gas-solido, in entrambi i casi la fase stazionaria è sulle pareti interne della colonna.

Hanno **maggiore efficienza** ma (poiché contengono meno fase stazionaria) la quantità di campione iniettabile è inferiore.

La maggiore efficienza è legata alla maggiore lunghezza ed all'assenza di impaccamento che elimina l'allargamento di banda dovuto ai percorsi multipli.



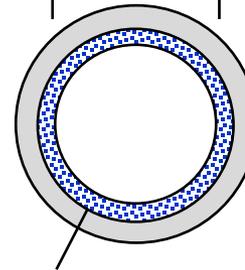
250 – 750  $\mu\text{m}$



Fase stazionaria  
porosa

Colonna tubolare aperta a  
supporto poroso  
(gascromatografia gas-solido)

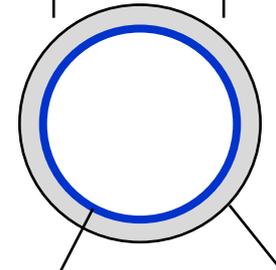
250 – 750  $\mu\text{m}$



Supporto poroso  
imbevuto di fase  
stazionaria

Colonna tubolare aperta a  
supporto ricoperto  
(gascromatografia gas-liquido)

250 – 750  $\mu\text{m}$



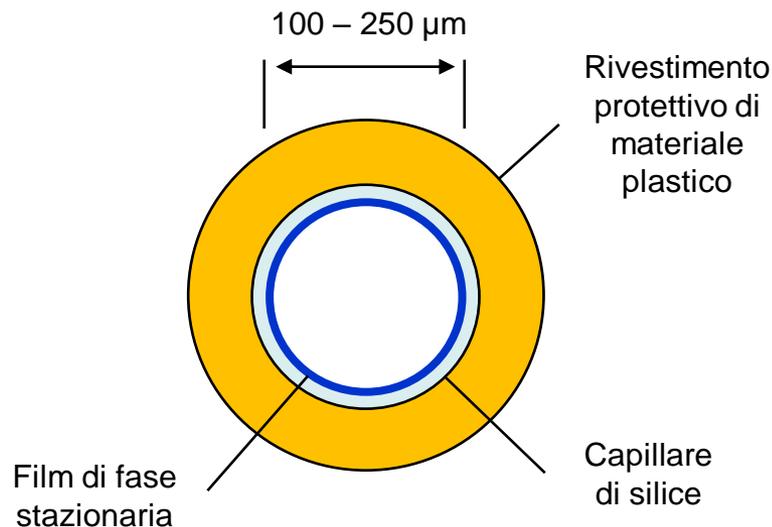
Film di fase  
stazionaria      Colonna  
(vetro, metallo)

Colonna tubolare aperta a  
pareti ricoperte  
(gascromatografia gas-liquido)

Le **colonne capillari** (o **colonne tubolari aperte a silice fusa**) sono molto lunghe (fino a 100 metri) e estremamente sottili (100 - 250  $\mu\text{m}$ ) ed hanno una fase stazionaria polimerica (sono quindi usate solo in gascromatografia gas-liquido) sotto forma di film sottile (pochi  $\mu\text{m}$ ) sulla parete interna della colonna.

Sono le **colonne più efficienti** ma le quantità di campione iniettabili sono molto piccole (richiedono quindi rivelatori ad alta sensibilità).

Le colonne capillari possono avere anche più di 100000 piatti teorici e sono adatte per l'analisi di miscele complesse.



### ***Ottimizzazione della separazione gascromatografica***

Gli equilibri in una colonna gascromatografica sono ***fortemente influenzati dalla temperatura***, che è il parametro principale (oltre alla natura della fase stazionaria) utilizzato per ottimizzare una separazione.

Un aumento di temperatura abbassa  $K_D$  e accorcia i tempi di ritenzione.

#### ***Cromatografia isoterma***

La temperatura è mantenuta costante ad un valore intermedio nell'intervallo di temperature di ebollizione degli analiti nel campione.

#### ***Cromatografia con programmazione della temperatura***

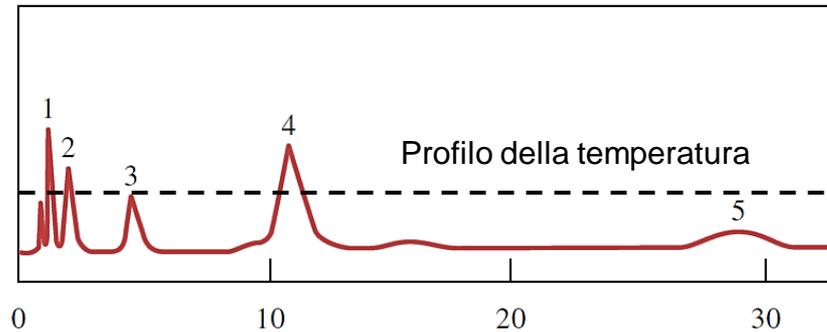
La temperatura viene aumentata nel corso della separazione in modo che ogni analita venga eluito nelle condizioni più adatte.

Questa gascromatografia è indicata quando gli analiti nel campione hanno un ***ampio intervallo di temperature di ebollizione*** e non è possibile individuare una singola temperatura che permetta la separazione ottimale di tutti.

# CROMATOGRAFIA

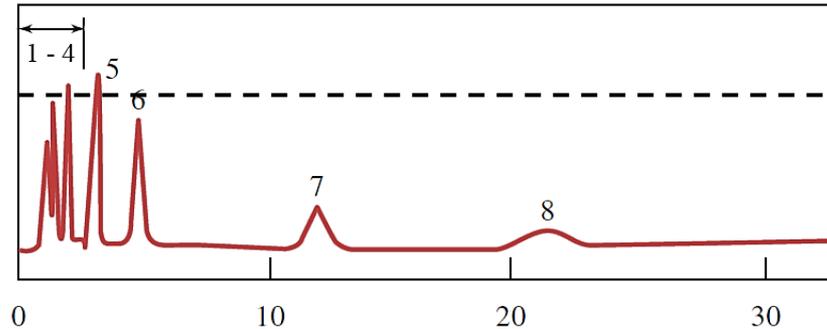
## GASCROMATOGRAFIA

### Separazioni gascromatografiche isoterme e con programmazione della temperatura



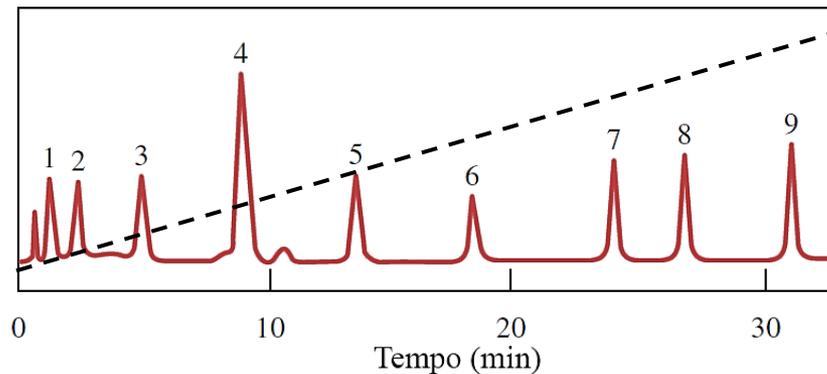
Separazione isoterma ( $T = 45^{\circ}\text{C}$ )

Gli analiti altobollenti hanno tempi di ritenzione troppo lunghi



Separazione isoterma ( $T = 145^{\circ}\text{C}$ )

Gli analiti bassobollenti hanno tempi di ritenzione troppo corti



Separazione a temperatura programmata ( $T$  crescente da 30 a  $180^{\circ}\text{C}$ )

# CROMATOGRAFIA

## GASCROMATOGRAFIA

### *Rivelatori*

Il rivelatore fornisce un segnale proporzionale alla concentrazione dell'analita in uscita dalla colonna.

Il **rivelatore ideale** dovrebbe avere le seguenti caratteristiche (nessun rivelatore le possiede tutte, ma alcuni vi si avvicinano abbastanza).

- Sensibilità
- Stabilità
- Riproducibilità
- Risposta lineare su un ampio intervallo di concentrazioni
- Risposta indipendente dalla natura dell'analita

### Detection limits and linear ranges of gas chromatography detectors

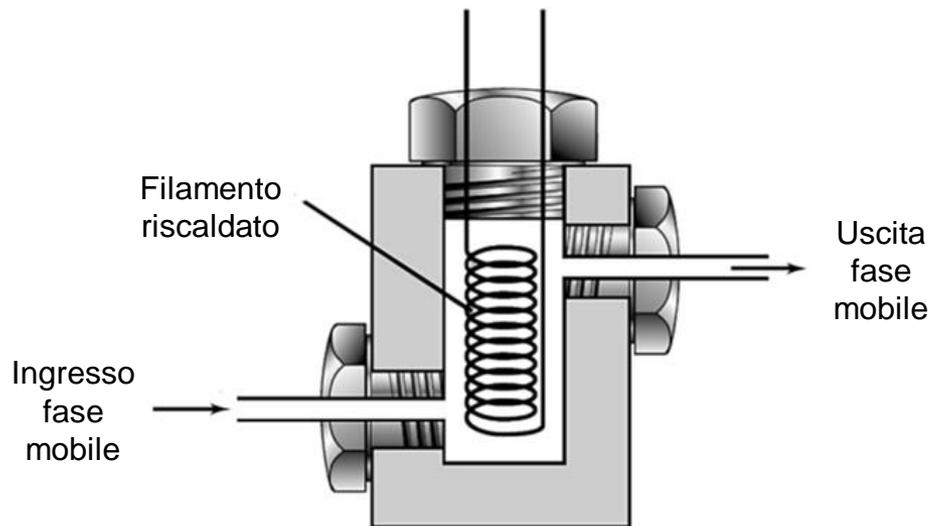
Detector	Approximate detection limit	Linear range
Thermal conductivity	400 pg/mL (propane)	$>10^5$
Flame ionization	2 pg/s	$>10^7$
Electron capture	As low as 5 fg/s	$10^4$
Flame photometric	$<1$ pg/s (phosphorus)	$>10^4$
	$<10$ pg/s (sulfur)	$>10^3$
Nitrogen-phosphorus	100 fg/s	$10^5$
Sulfur chemiluminescence	100 fg/s (sulfur)	$10^5$
Photoionization	25 pg to 50 pg (aromatics)	$>10^5$
Vacuum ultraviolet absorbance	15–250 pg	$10^3$
Mass spectrometric	25 fg to 100 pg	$10^5$

# CROMATOGRAFIA

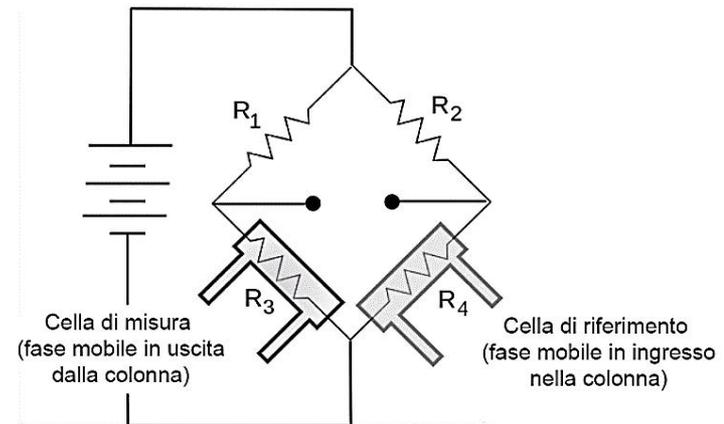
## GASCROMATOGRAFIA

Il **rivelatore a conducibilità termica** misura la conducibilità termica della fase mobile (un gas leggero ad elevata conducibilità termica, es. elio) con un filamento conduttore caldo. La conducibilità termica di un gas è inversamente proporzionale al suo peso molecolare, quindi in presenza di analiti a elevato peso molecolare la conducibilità termica della fase mobile diminuisce e la temperatura del filamento (che è raffreddato dal flusso della fase mobile) aumenta.

Conduttori per il riscaldamento del filamento e la rilevazione della temperatura



Il rivelatore rileva **qualsunque sostanza** con peso molecolare maggiore dal gas di trasporto e ha un ampio intervallo dinamico. La sua limitazione è la bassa sensibilità, che lo rende inadatto all'uso con colonne a bassa capacità (es. colonne capillari).

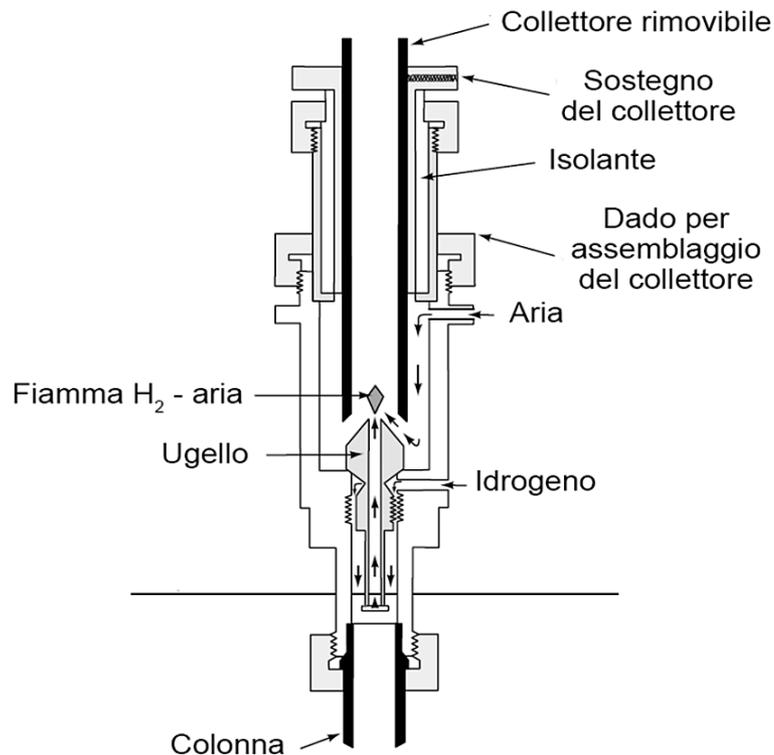


Le misure di conducibilità termica sono delicate, spesso si impiegano celle in parallelo per comparare le conducibilità termiche delle fasi mobili in ingresso e uscita dalla colonna

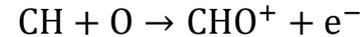
# CROMATOGRAFIA

## GASCROMATOGRAFIA

Il **rivelatore a ionizzazione di fiamma (FID)** sfrutta la formazione di ioni a seguito della combustione di analiti di natura organica ed è uno dei rivelatori più usati in gascromatografia. La fase mobile in uscita dalla colonna viene bruciata in una fiamma aria/idrogeno e gli ioni prodotti vengono rilevati da un elettrodo collettore posto sopra la fiamma.



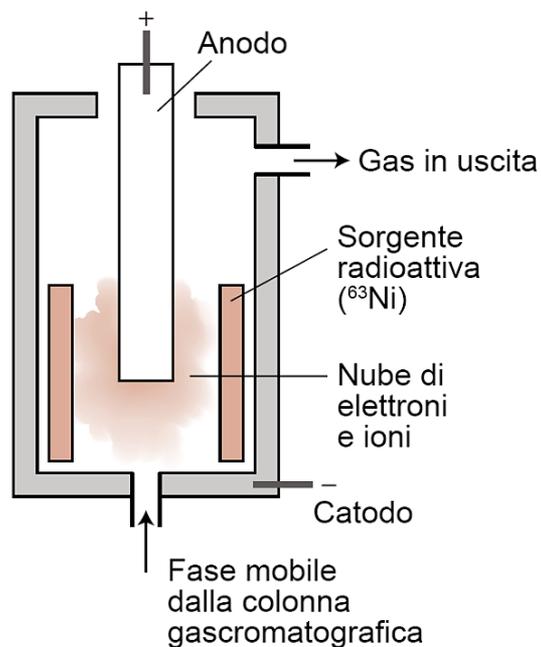
La formazione di ioni avviene attraverso reazioni come la seguente (i radicali CH si ottengono dalla combustione dei composti organici):



Il rivelatore è sensibile a tutti i **composti organici combustibili** (es. idrocarburi, alcoli, chetoni, esteri) ma non rivela composti inorganici o composti organici non combustibili (es. molecole altamente alogenate).



Il **rivelatore a cattura di elettroni (EC)** sfrutta il processo di cattura di elettroni da parte di analiti con atomi molto elettronegativi. Un emettitore  $\beta$  (es.  $^{63}\text{Ni}$ ) ionizza il gas nel rivelatore (azoto o metano, aggiunti alla fase mobile in ingresso nel rivelatore). Le specie cariche prodotte ( $\text{N}_2^+$ ,  $\text{CH}_4^+$  e elettroni) generano una corrente elettrica fra un catodo rivestito con l'emettitore  $\beta$  e un anodo di raccolta. Se la fase mobile contiene analiti con atomi elettronegativi, parte degli elettroni viene catturata e la corrente diminuisce.



Il rivelatore è sensibile a **composti organici alogenati**, altri composti con gruppi elettronegativi (es. nitrogruppi, nitrili) e composti organometallici. Questo rivelatore è molto impiegato in analisi ambientale per la determinazione di composti alogenati quali pesticidi, diossine, PCB.



Modulo di un rivelatore a cattura di elettroni

Le tecniche di cromatografia liquida permettono l'analisi di composti non volatili (es. specie ad alto peso molecolare, specie ioniche, macromolecole) ma solubili in adatti solventi.

Anch'esse sono classificabili in base alle **caratteristiche della fase stazionaria** ed ai **processi responsabili della ritenzione** degli analiti.

### **Adsorbimento**

Separazione di specie organiche

### **Ripartizione**

Separazione di specie organiche

### **Scambio ionico**

Separazione di specie cariche

### **Esclusione dimensionale**

Separazione di macromolecole (anche di natura biologica) e polimeri

### **Affinità**

Separazione di specie per le quali esistono adatti ligandi (es. anticorpi)

Una importante differenza dalla gascromatografia è che nella cromatografia liquida la fase mobile **prende parte al processo cromatografico**.

Le tecniche di cromatografia liquida sono molto versatili in quanto sono applicabili a moltissime sostanze e sfruttano **diversi meccanismi di ritenzione** (è quindi possibile separare gli analiti in base a differenti proprietà chimico-fisiche).

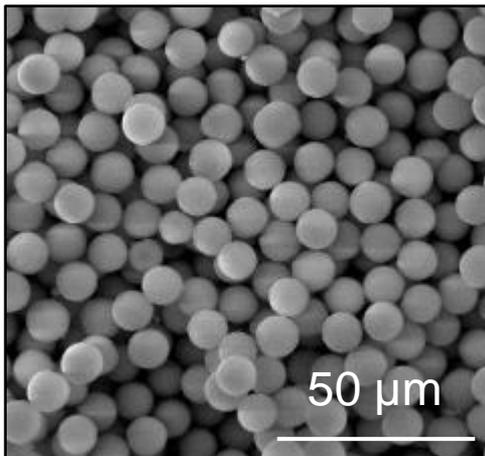
# CROMATOGRAFIA

## CROMATOGRAFIA LIQUIDA

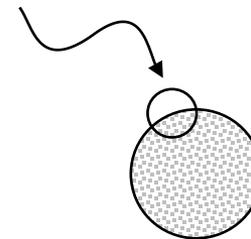
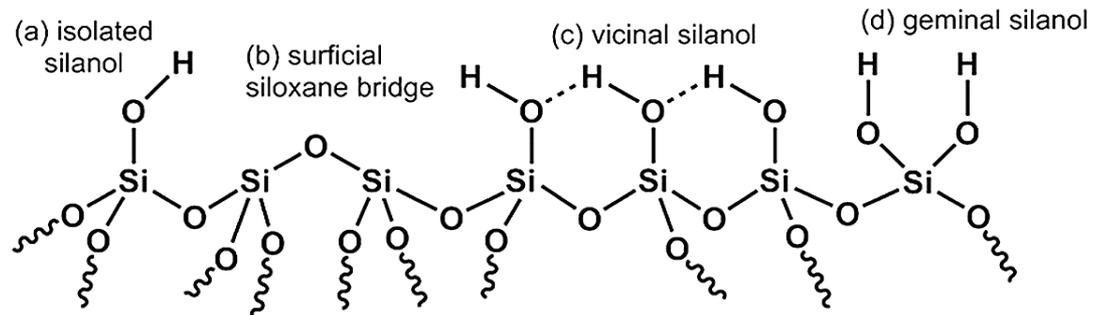
### *Cromatografia di adsorbimento*

La fase stazionaria è un **materiale adsorbente polare**, es. silice ( $\text{SiO}_2$ ) o allumina ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ), con elevata area superficiale (tipicamente 50 - 100  $\text{m}^2/\text{g}$ ).

La separazione si basa sul legame degli analiti sui siti attivi del materiale adsorbente grazie ad interazioni relativamente forti (es. legami a idrogeno, interazioni dipolo-dipolo o dipolo-dipolo indotto).



Fase stazionaria a base di particelle di silice



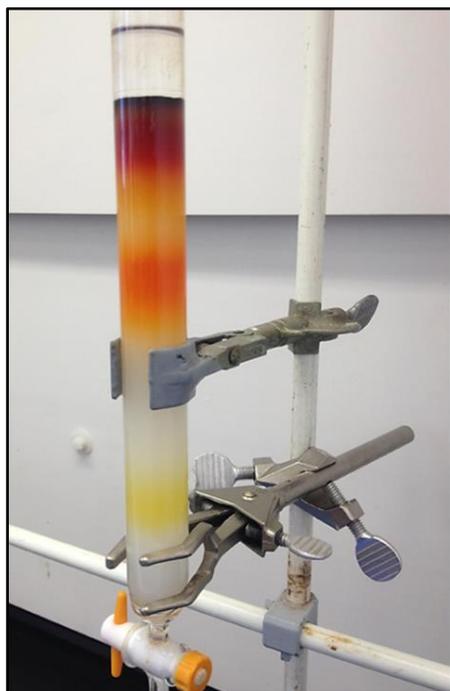
Le particelle di silice (ottenute per precipitazione e successiva disidratazione di silicati solubili, es.  $\text{Na}_2\text{SiO}_4$ ) espongono sulla superficie **gruppi polari** quali gruppi silanolici ( $\text{Si-OH}$ ) e silossanici ( $\text{Si-O-Si}$ )

# CROMATOGRAFIA

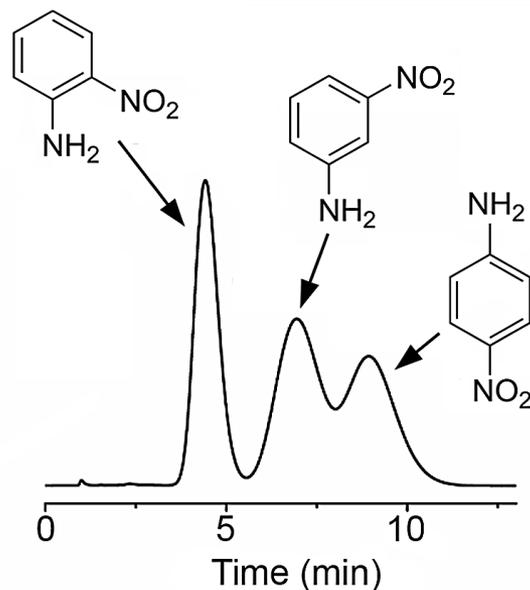
## CROMATOGRAFIA LIQUIDA

Questa tecnica è usata per purificare i prodotti di una sintesi organica in quanto permette di separare composti differenti (la fase stazionaria interagisce con i **gruppi funzionali** degli analiti) e spesso anche isomeri (es. isomeri geometrici) di un singolo composto.

Le fasi stazionarie sono polari: questa tecnica cromatografica non è adatta alla **separazione di sostanze apolari**.



Separazione dei prodotti di una sintesi organica



Separazione di isomeri della nitroanilina su  $\text{Al}_2\text{O}_3$

L'isomero para è più trattenuto perché i gruppi funzionali interagiscono maggiormente con l'allumina (negli isomeri meta e orto i gruppi sono vicini e possono interagire con un minor numero di siti attivi della fase stazionaria)

Purificazione mediante cromatografia di adsorbimento:  
<https://www.youtube.com/watch?v=KGTZ3XBEfyc>

# CROMATOGRAFIA

## CROMATOGRAFIA LIQUIDA

Nella cromatografia di adsorbimento il solvente **compete con gli analiti** per i siti della fase stazionaria e quindi influenza la separazione. I solventi che interagiscono più fortemente con la fase stazionaria hanno maggiore potere eluente (ostacolano la ritenzione degli analiti) e riducono i tempi di ritenzione.

Poiché la fase stazionaria è polare, **vengono eluiti per primi gli analiti meno polari** (che si legano meno alla fase stazionaria).

### Serie eluotropica

Solvent	Eluent strength ( $\epsilon^\circ$ )
Pentane	0.00
Hexane	0.01
Heptane	0.01
Trichlorotrifluoroethane	0.02
Toluene	0.22
Chloroform	0.26
Dichloromethane	0.30
Diethyl ether	0.43
Ethyl acetate	0.48
Methyl <i>t</i> -butyl ether	0.48
Dioxane	0.51
Acetonitrile	0.52
Acetone	0.53
Tetrahydrofuran	0.53
2-Propanol	0.60
Methanol	0.70

Affinità crescente per la fase stazionaria polare

Nella separazione di analiti polari è necessario usare solventi con elevato potere eluente per non avere tempi di ritenzione troppo lunghi

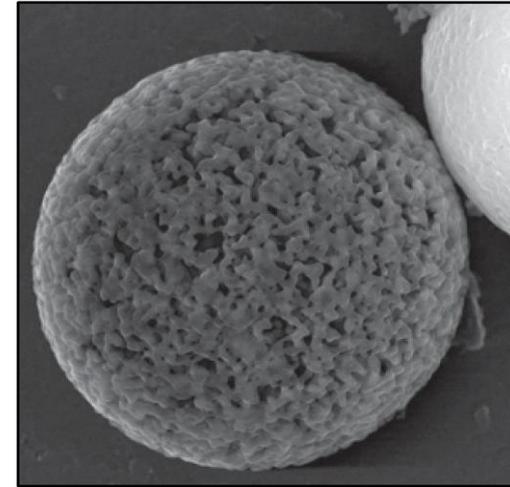
# CROMATOGRAFIA

## CROMATOGRAFIA LIQUIDA

### *Cromatografia di ripartizione*

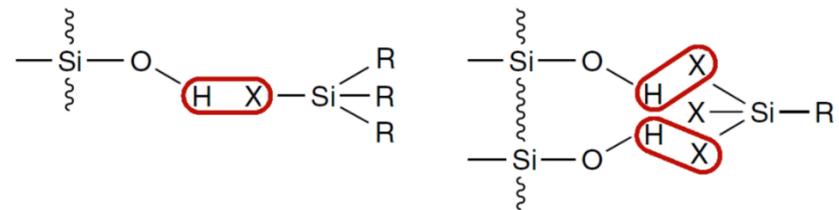
La fase stazionaria compete con la fase mobile agendo come solvente per gli analiti. Nella maggior parte dei casi si usano **fasi stazionarie legate** su particelle microporose di silice (le molecole della fase stazionaria vengono legate covalentemente alla silice grazie ai gruppi -OH superficiali).

Le prime cromatografie di ripartizione usavano come fase stazionaria un **liquido immiscibile con la fase mobile** su di un supporto poroso inerte. Durante l'uso le colonne però perdevano la fase stazionaria a causa della sua sia pur minima solubilità nella fase mobile.



Particella microporosa di silice (diametro 4,4  $\mu\text{m}$ )

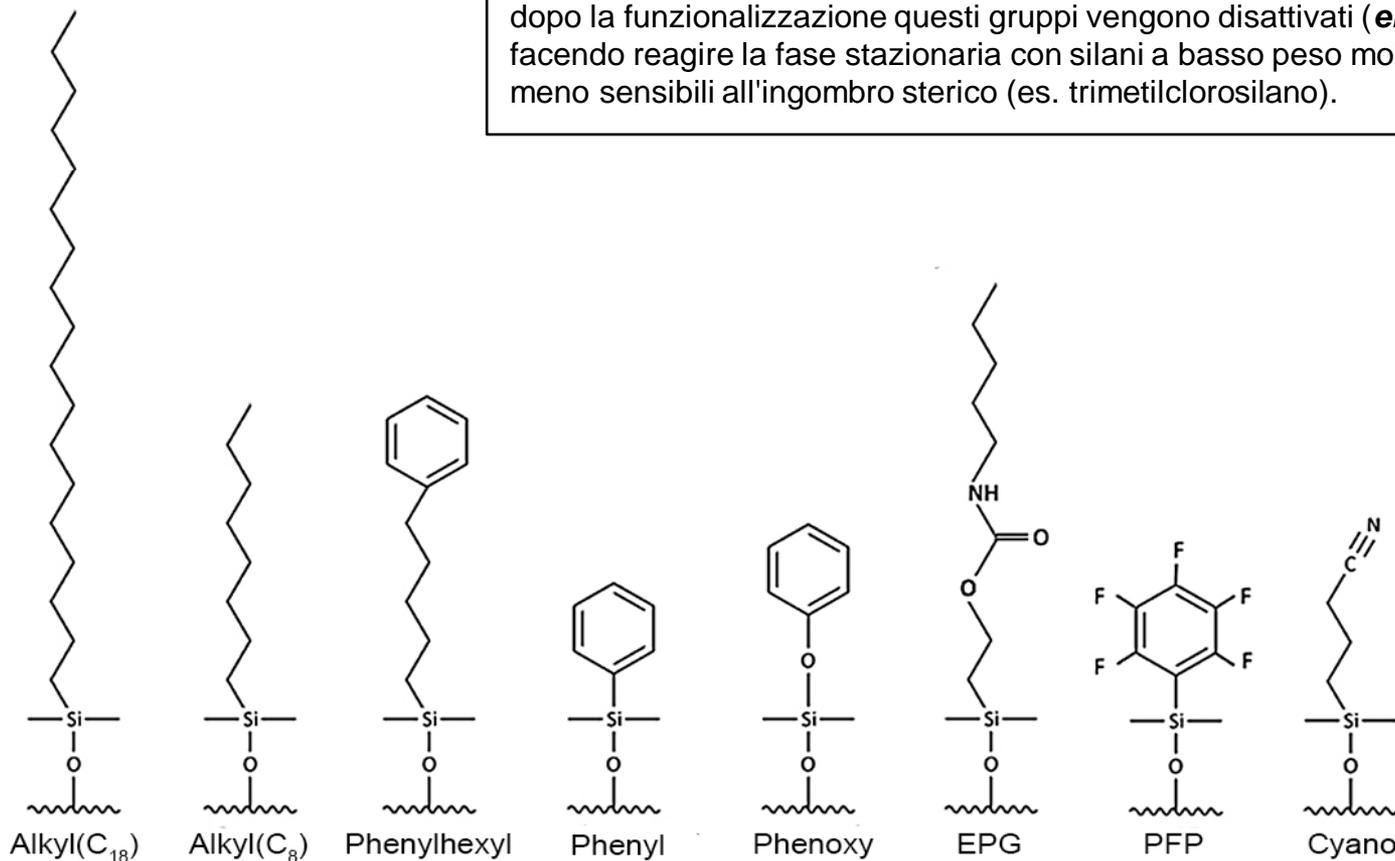
La separazione è basata sulla **ripartizione** degli analiti fra le due fasi ed è legata alla loro diversa solubilità (anche qui la polarità è un fattore determinante).



Funzionalizzazione di gruppi -OH superficiali delle particelle di silice per la sintesi di fasi stazionarie legate

Variando la natura dei gruppi legati alla silice è possibile ottenere fasi stazionarie a diversa polarità per la separazione di composti con caratteristiche differenti.

Per evitare interazioni con gli analiti dovute a eventuali gruppi  $-OH$  residui, dopo la funzionalizzazione questi gruppi vengono disattivati (**endcapping**) facendo reagire la fase stazionaria con silani a basso peso molecolare, meno sensibili all'ingombro sterico (es. trimetilclorosilano).



Polarità crescente  $\longrightarrow$

# CROMATOGRAFIA

## CROMATOGRAFIA LIQUIDA

Le separazioni mediante cromatografia di ripartizione vengono classificate in base alle **polarità relative** di fase mobile e fase stazionaria.

### **Cromatografia di ripartizione in fase inversa**

La fase stazionaria è **meno polare** della fase mobile (in genere una miscela di acqua e solventi organici polari, es. metanolo o acetonitrile).

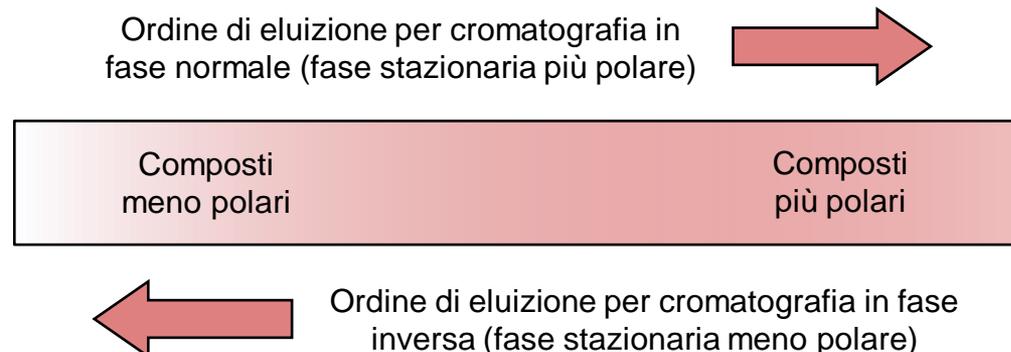
Vengono eluiti per primi i composti più polari (interagiscono meno con la fase stazionaria).

### **Cromatografia di ripartizione in fase normale**

La fase stazionaria è **più polare** della fase mobile (un solvente organico o una miscela di solventi organici).

Vengono eluiti per primi i composti meno polari.

Questa cromatografia è poco usata (es. viene impiegata per composti molto polari quali zuccheri) perché le fasi stazionarie polari danno interazioni molto forti e sono più soggette a contaminazioni.



# CROMATOGRAFIA

## CROMATOGRAFIA LIQUIDA

### *Cromatografia di ripartizione in fase inversa*

#### **Colonna**

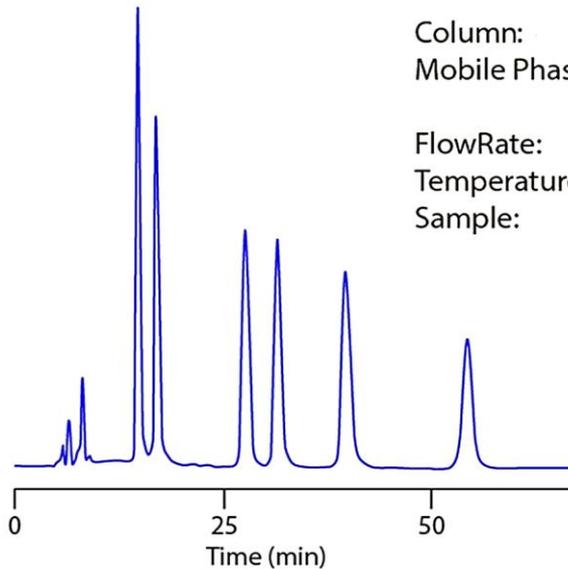
Le colonne più utilizzate usano fasi stazionarie apolari (es. silice-C<sub>8</sub> o silice-C<sub>18</sub>)



Column: C18 4.6 x 150 mm, 5 µm  
Mobile Phase: 40% phosphate buffer  
60% ACN  
FlowRate: 1.5 mL/min  
Temperature: 40°C  
Sample: Tricyclic Antidepressants  
1. Desipramine  
2. Nortriptyline  
3. Doxepin  
4. Imipramine  
5. Amitriptyline  
6. Trimipramine

#### **Fase mobile**

Si usano soluzioni acquose (con acidi, basi o tamponi nel caso si debba controllare il pH) o miscele di acqua e solventi organici (es. alcoli, acetonitrile, acetone)



L'uso di miscele permette di controllare in modo semplice la polarità della fase mobile variandone la composizione.

Separazione di antidepressivi triciclici mediante cromatografia HPLC in fase inversa

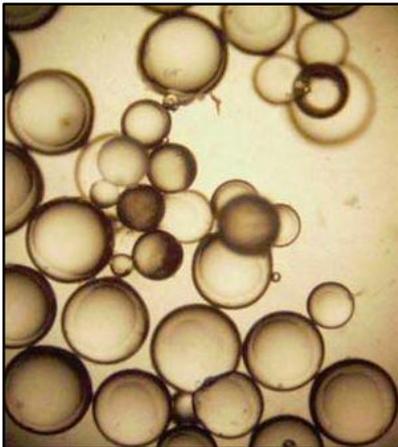
# CROMATOGRAFIA

## CROMATOGRAFIA LIQUIDA

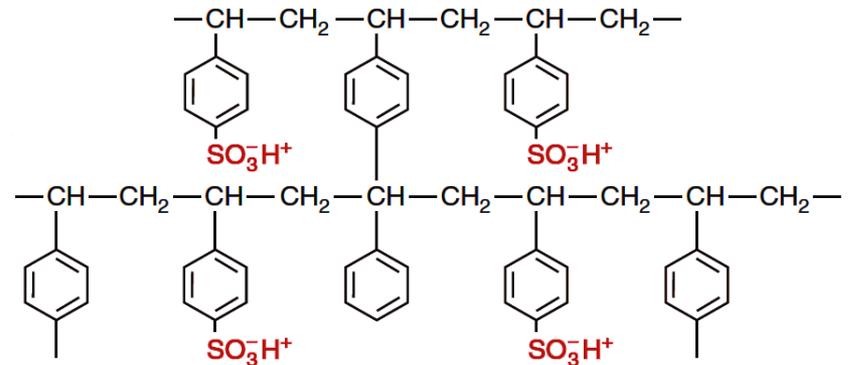
### *Cromatografia di scambio ionico*

La fase stazionaria è un solido (spesso un polimero organico, es. un copolimero stirene-divinilbenzene) contenente **siti attivi ionizzati** con carica opposta rispetto agli analiti ionici.

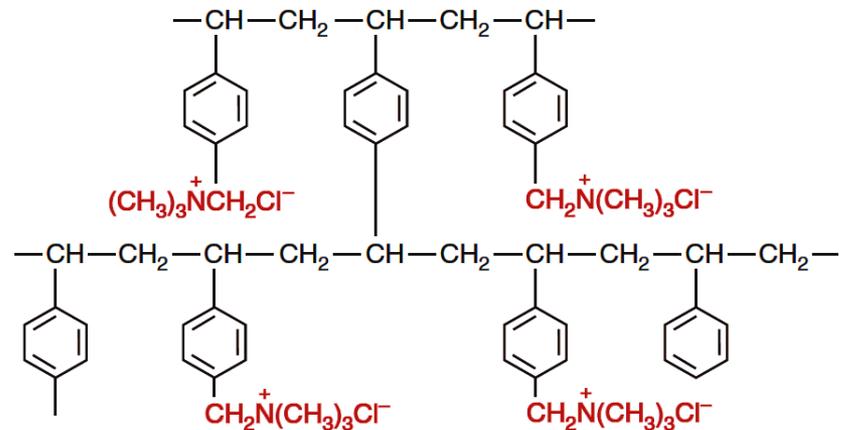
La separazione è basata sulla **competizione** fra gli ioni dell'analita e quelli contenuti nella fase mobile (una fase acquosa con un elettrolita) per i siti della fase stazionaria.



Particelle di copolimero stirene-divinilbenzene



Resina a scambio cationico forte basata su copolimero stirene-divinilbenzene



Resina a scambio anionico forte basata su copolimero stirene-divinilbenzene

# CROMATOGRAFIA

## CROMATOGRAFIA LIQUIDA

Le resine a scambio ionico vengono classificate in **resine scambiatrici forti** e **resine scambiatrici deboli** in base all'intervallo di pH nel quale sono attive.

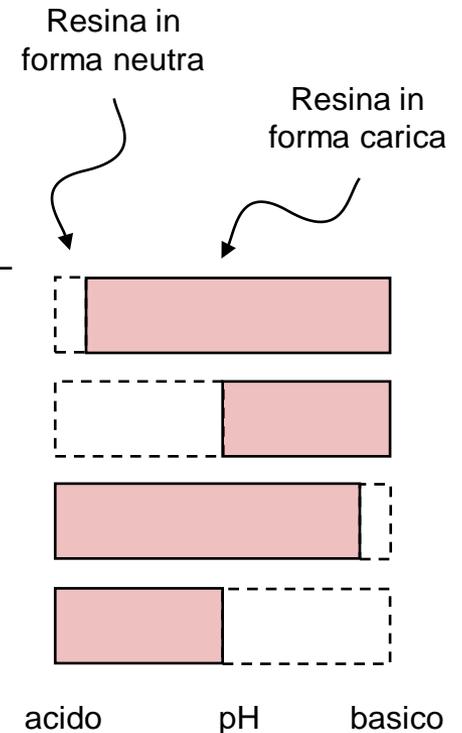
Le resine scambiatrici forti sono sempre cariche mentre quelle deboli sono cariche (e quindi utilizzabili) solo in un intervallo ristretto di pH.

Per una resina scambiatrice debole la ritenzione degli ioni può essere controllata variando il **pH** della fase mobile.

La resina chelante ha gruppi di legame simili all'EDTA e non lega i cationi dei metalli alcalini

### Gruppo scambiatore nella resina

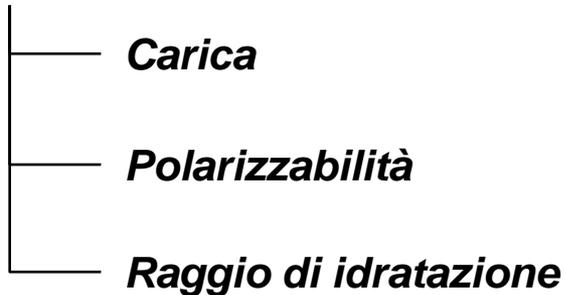
- SO<sub>3</sub><sup>-</sup> (resina a scambio cationico forte)
- COO<sup>-</sup> (resina a scambio cationico debole)
- N(CH<sub>2</sub>COO<sup>-</sup>)<sub>2</sub> (resina chelante)
- NR<sub>3</sub><sup>+</sup> (resina a scambio anionico forte)
- NH<sub>2</sub><sup>+</sup> o ammine (resina a scambio anionico debole)



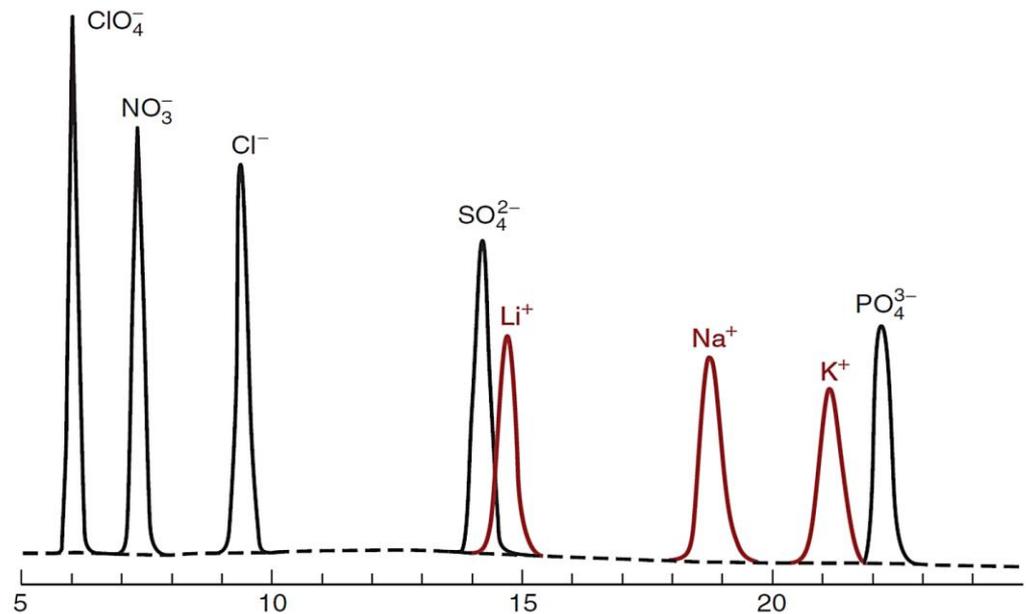
# CROMATOGRAFIA

## CROMATOGRAFIA LIQUIDA

L'affinità degli ioni dell'analita per la fase stazionaria dipende dalle interazioni elettrostatiche con i gruppi carichi della resina, legate alle proprietà chimico-fisiche dello ione.



In generale sono trattenuti più fortemente ioni a **carica elevata** (è comunque il fattore predominante), **elevata polarizzabilità** (associata a maggiori dimensioni) e **piccolo raggio di idratazione**. Per queste analisi viene normalmente utilizzato un **rivelatore a conducibilità**, sensibile a qualunque specie carica.



Separazione simultanea di anioni e cationi su una colonna a letto misto, contenente resine scambiatrici sia anioniche che cationiche

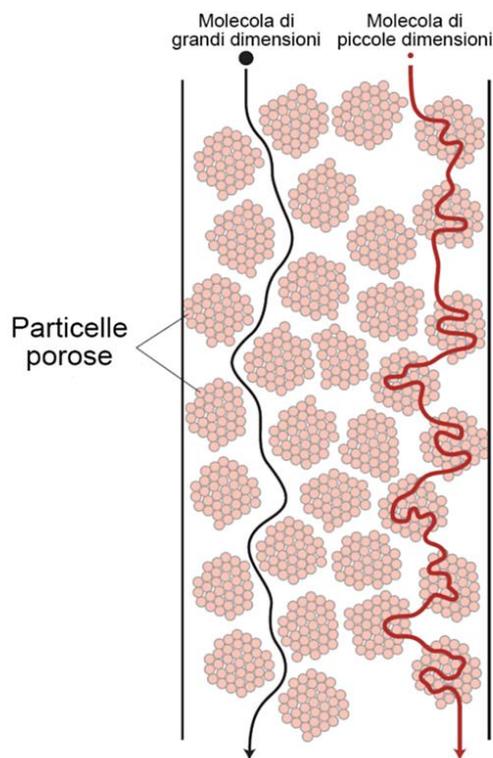
# CROMATOGRAFIA

## CROMATOGRAFIA LIQUIDA

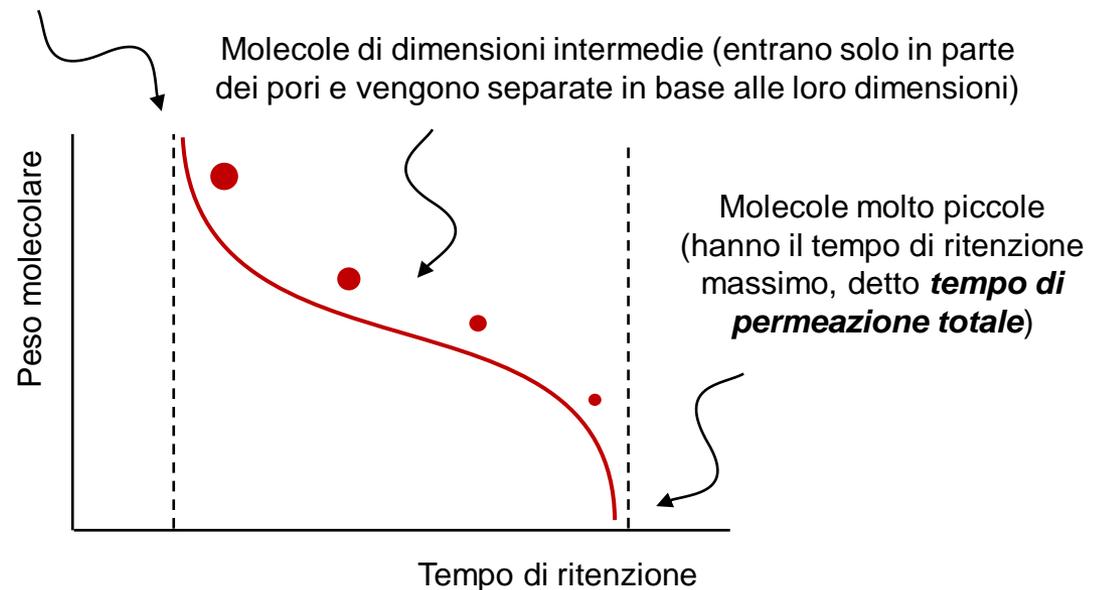
### **Cromatografia di esclusione dimensionale**

La fase stazionaria è un **materiale poroso** (es. un polimero o un gel) con pori di dimensioni paragonabili alle molecole degli analiti. La separazione degli analiti avviene in base alle loro dimensioni (gli analiti piccoli entrano nei pori e sono rallentati, quelli più grandi restano nella fase mobile e si muovono più velocemente).

E' indispensabile che **non ci siano interazioni specifiche** con la fase stazionaria (la separazione deve dipendere solo dalle dimensioni molecolari).



Molecole troppo grandi  
(hanno il tempo di ritenzione minimo)



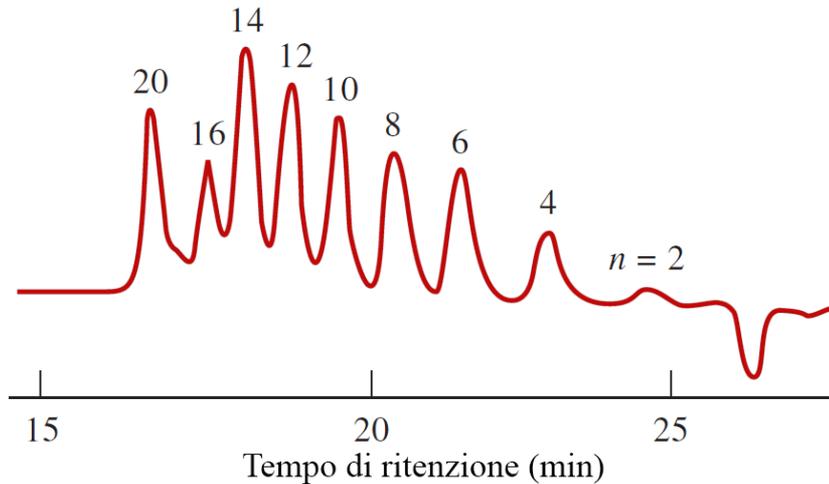
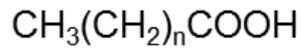
Curva di calibrazione delle masse molecolari per una cromatografia di esclusione dimensionale

# CROMATOGRAFIA

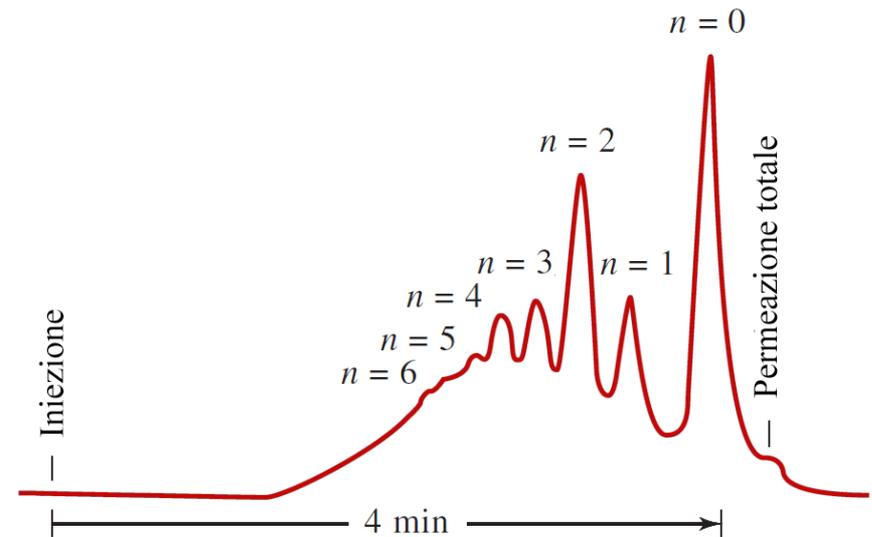
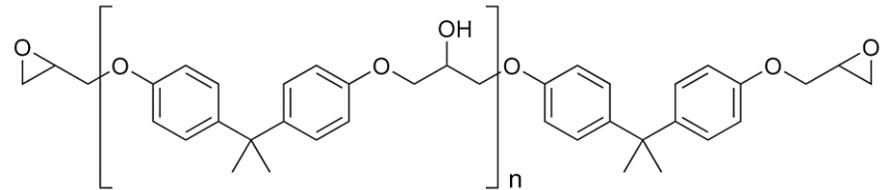
## CROMATOGRAFIA LIQUIDA

La **cromatografia di permeazione su gel** viene utilizzata per la separazione di sostanze organiche insolubili in acqua (es. polimeri organici) e impiega come fase mobile un solvente organico.

Separazione di acidi grassi



Separazione di oligomeri di resina epossidica



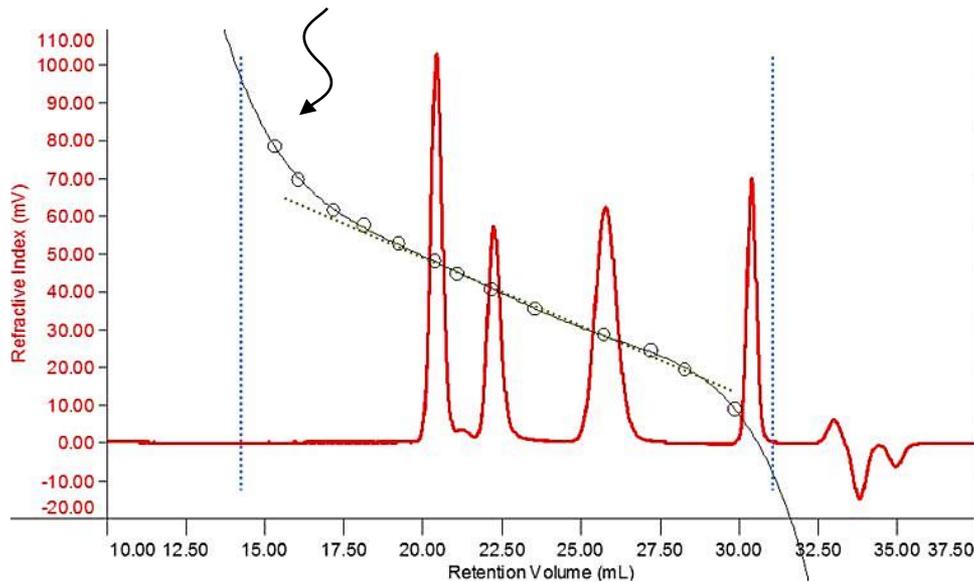
# CROMATOGRAFIA

## CROMATOGRAFIA LIQUIDA

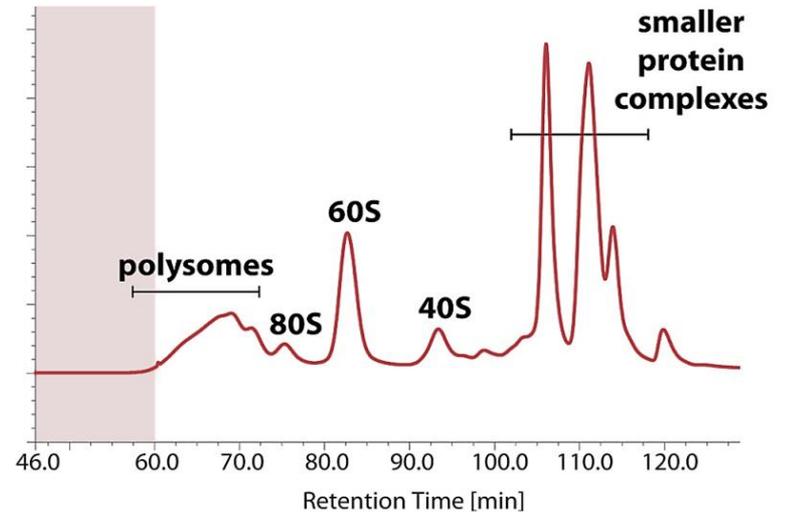
La **cromatografia di filtrazione su gel** viene utilizzata per sostanze solubili in acqua e permette quindi di separare anche macromolecole biologiche (es. proteine) impiegando fasi mobili acquose.

Poiché la separazione dipende dalle dimensioni delle molecole, anche la forma può essere un fattore rilevante (es. proteine globulari e anticorpi potrebbero non essere trattiene nello stesso modo a parità di peso molecolare).

Curva di calibrazione ottenuta analizzando proteine a peso molecolare noto

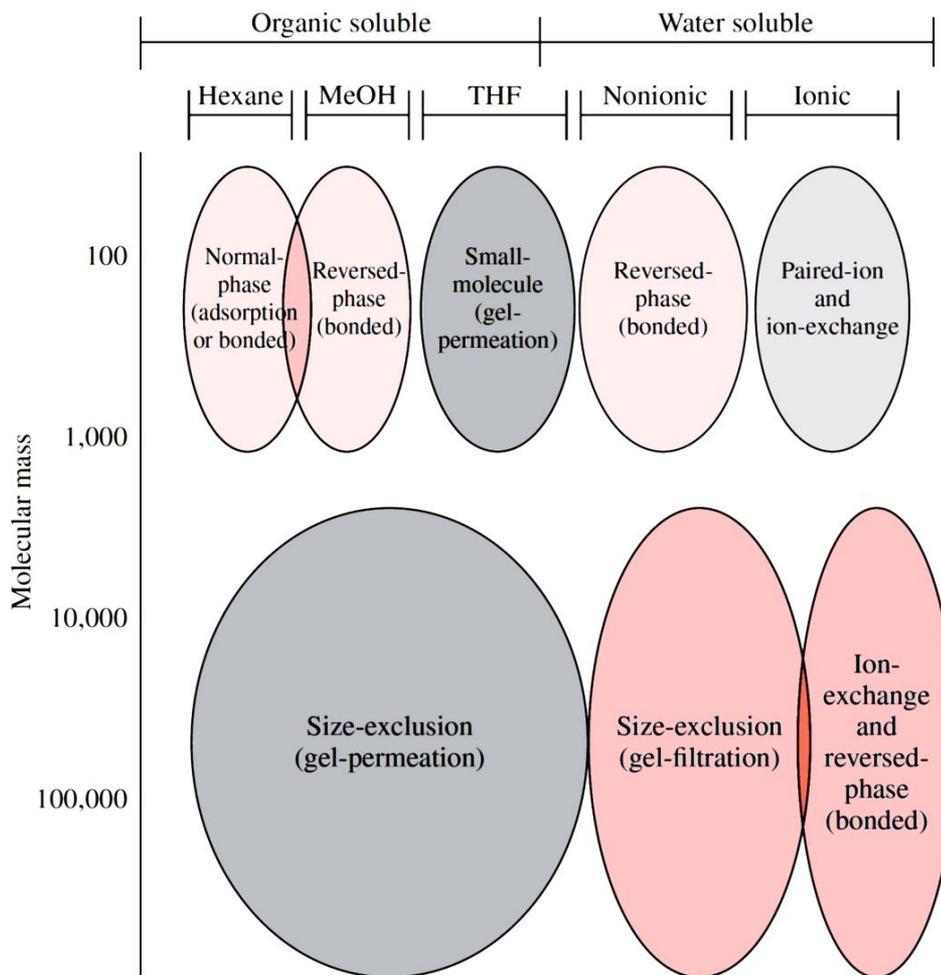


Separazione di proteine



Separazione di subunità ribosomiali

*Quale tecnica cromatografica utilizzare?*



# CROMATOGRAFIA

## CROMATOGRAFIA LIQUIDA

### *Cromatografia di affinità*

La fase stazionaria è un supporto solido sul quale sono immobilizzati **ligandi** (in genere di natura biologica, es. anticorpi) specifici per gli analiti di interesse. L'interazione si basa sul **riconoscimento biospecifico** dell'analita (o di una classe di analiti) mediante interazioni forti e molto selettive.

Per la elevata selettività dei ligandi (spesso viene trattenuta solo una specie) queste tecniche possono essere anche considerate **tecniche di estrazione** per il recupero di un analita da un campione.

### *Ligandi di natura biologica e biomolecole trattenute*

<b>Ligando</b>	<b>Biomolecole trattenute</b>
Streptavidina	Biomolecole biotinilate (es. proteine o anticorpi)
Proteine A o G	Immunoglobuline
Anticorpi	Antigeni
Antigeni	Anticorpi
Polideossitimidina (poli-dT)	Acidi nucleici con sequenze terminali di poliadenina (poli-A)



Colonna di immunoaffinità per l'estrazione di aflatossine da campioni alimentari

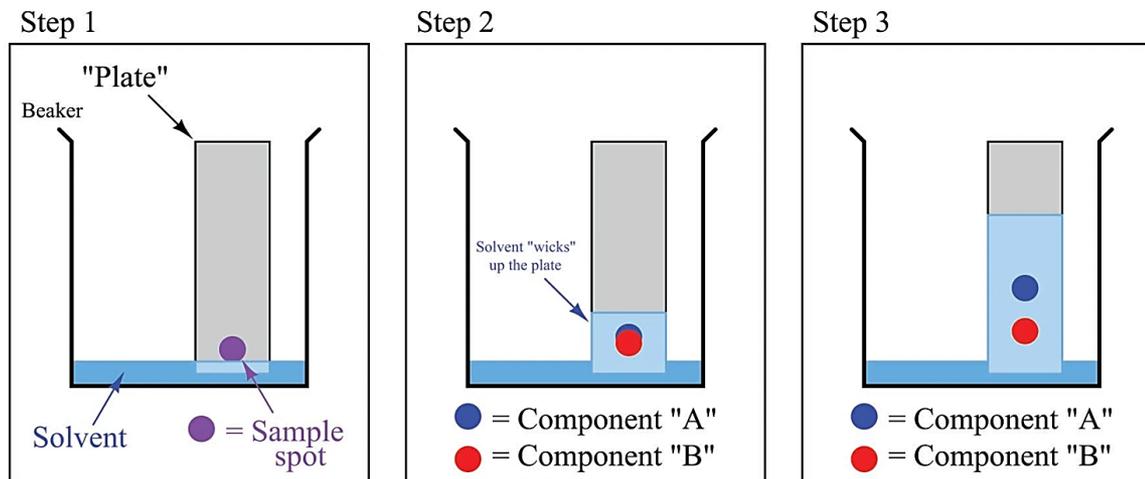
# CROMATOGRAFIA SU STRATO SOTTILE (TLC)

## *Che cos'è una cromatografia su strato sottile?*

La **cromatografia su strato sottile (TLC)** è una tecnica di cromatografia planare per l'analisi qualitativa di miscele relativamente semplici.

Una tecnica TLC permetta anche stime quantitative, ma esse sono in genere basate su confronti piuttosto che fornire quantità assolute.

Si usano lastre costituite da un supporto rivestito da uno strato di fase stazionaria. Il campione (pochi  $\mu\text{L}$ ) viene depositato vicino al bordo inferiore della lastra. La lastra viene poi trasferita in una camera cromatografica con l'estremità immersa nella fase mobile, che risale per capillarità separando gli analiti.



Procedura di una cromatografia su strato sottile

## CROMATOGRAFIA SU STRATO SOTTILE (TLC)

### *Fasi stazionarie per cromatografia su strato sottile*

Le lastre (es. in vetro o alluminio) sono rivestite con uno strato di **silice** od **allumina** (per cromatografia di adsorbimento) o di **cellulosa** (per cromatografia di ripartizione in fase normale, la fase stazionaria è in realtà l'acqua adsorbita sulla cellulosa). La fase mobile è generalmente una miscela di solventi organici volatili, la cui composizione viene variata per ottimizzare la separazione.



Lastre per TLC su supporto di vetro

Lastre per TLC su foglio di alluminio



Sono più adatte per veloci analisi qualitative (es. per seguire una reazione chimica) perché possono essere tagliate in modo da utilizzare solo la parte strettamente necessaria



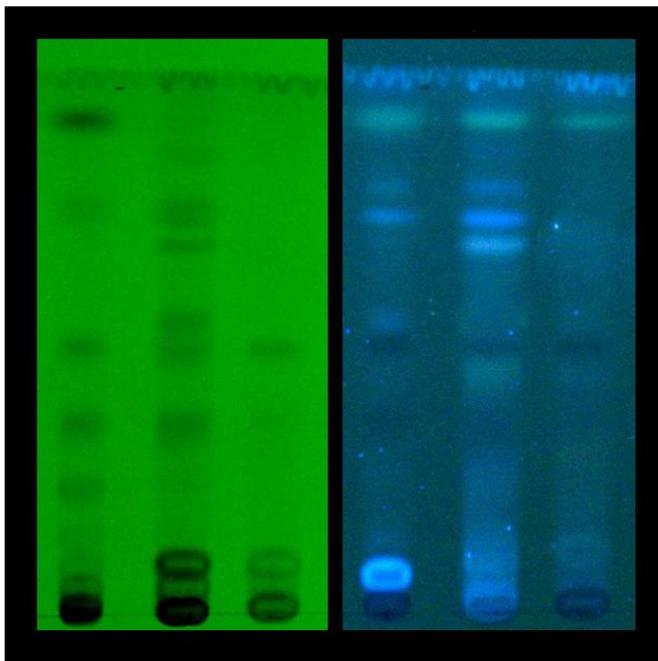
Sistema per la preparazione di lastre per TLC su supporti di vetro

### **Rivelazione**

Se le sostanze da separare sono incolori si utilizzano spesso lastre con una sostanza fluorescente (es. un fosforo inorganico). La rivelazione sfrutta l'assorbimento degli analiti nell'UV: quando la lastra viene illuminata con una lampada UV gli analiti appaiono come macchie scure perché assorbono la radiazione ultravioletta impedendo l'eccitazione del fosforo.

#### **Illuminazione a 254 nm**

Evidenzia gli analiti in grado di assorbire (a questa lunghezza d'onda viene eccitato il fosforo contenuto nella lastra)



Per analisi semiquantitative è possibile usare **densitometri** o **sistemi di imaging** in grado di registrare e quantificare i segnali degli analiti.

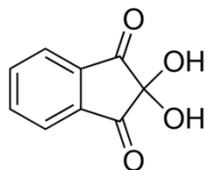
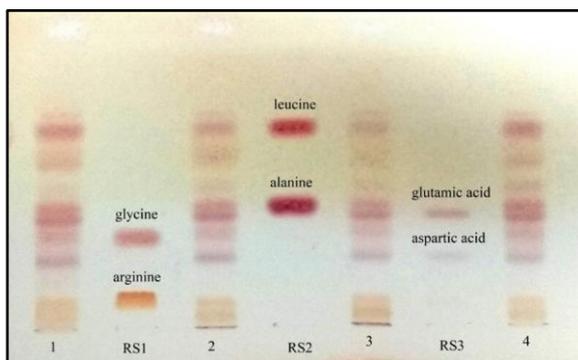
#### **Illuminazione a 366 nm**

Evidenzia gli analiti naturalmente fluorescenti (a questa lunghezza d'onda il fosforo nella lastra non viene eccitato)

# CROMATOGRAFIA SU STRATO SOTTILE (TLC)

Per la rivelazione visuale si usano **reattivi cromogeni** più o meno specifici, nebulizzati sulle lastre dopo evaporazione della fase mobile residua (se il reattivo è volatile, es.  $I_2$ , la lastra può anche essere esposta direttamente ai suoi vapori).

Spesso la reazione di rivelazione avviene a caldo e la lastra deve essere riscaldata in una stufa, che può essere usata anche per eliminare la fase mobile residua.



Soluzione di ninidrina per lo sviluppo di lastre TLC

## Comuni reattivi cromogeni

<i>Reattivo</i>	<i>Sostanze rivelate</i>
$AgNO_3$ ammoniacale	Sostanze riducenti
Iodio (vapori)	Composti organici insaturi
Ninidrina	Aminoacidi, ammine
$H_2SO_4$ concentrato	Sostanze organiche
Acido molibdicco	Fosfolipidi e derivati
$KMnO_4$ in soluzione acida	Uso generale

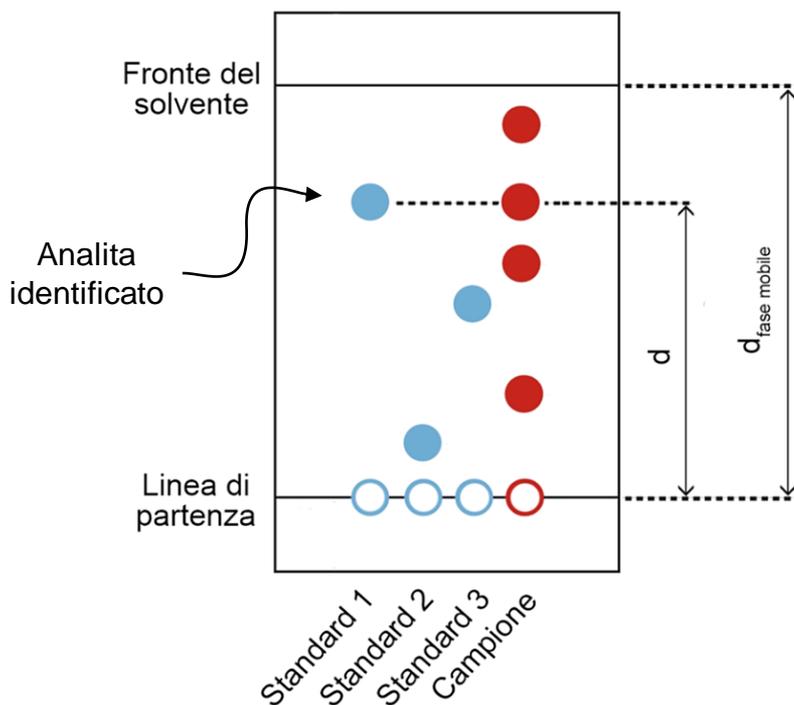
Proceduta per una analisi mediante TLC:

<https://www.youtube.com/watch?v=462CmolEFhc>

# CROMATOGRAFIA SU STRATO SOTTILE (TLC)

## Come si identificano gli analiti in TLC?

Nella cromatografia su strato sottile la velocità di migrazione degli analiti viene descritta dal **fattore di ritenzione ( $R_f$ )**. Per garantire una corretta identificazione il confronto degli  $R_f$  viene fatto direttamente sulla lastra facendo correre assieme al campione in esame anche gli standard.



Per potere calcolare  $R_f$  la fase mobile **non deve raggiungere l'estremità superiore della lastra**.

$$R_f = \frac{d}{d_{\text{fase mobile}}}$$

Il fattore di ritenzione varia fra 0 (analiti non eluiti) e 1 (analiti che migrano con la fase mobile). A causa delle dimensioni degli spot e delle irregolarità del fronte del solvente vengono considerati ottimali per una identificazione valori di  $R_f$  **fra 0,3 e 0,7**.

Identificazione di un analita mediante TLC

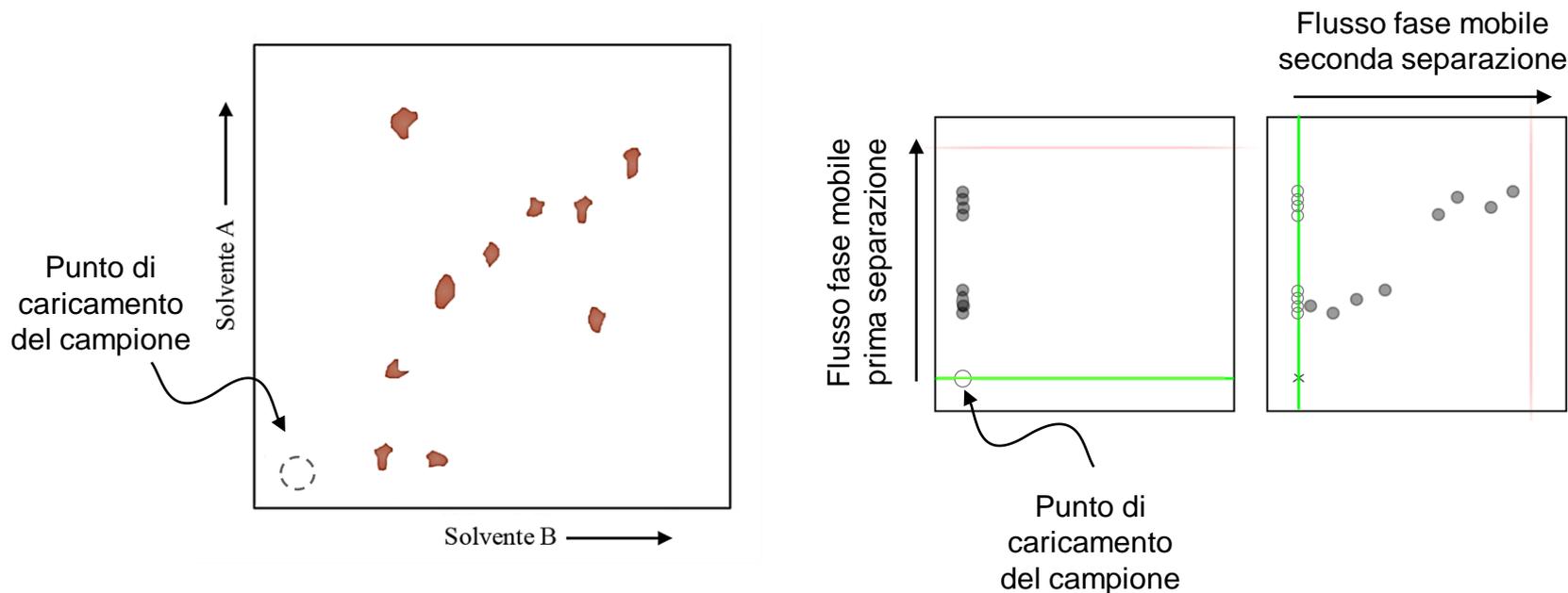
# CROMATOGRAFIA SU STRATO SOTTILE (TLC)

## *Come si migliorano le prestazioni di un cromatografia planare?*

L'efficienza di una TLC è relativamente bassa e non è possibile separare analiti con valori di  $R_f$  simili o analizzare miscele complesse.

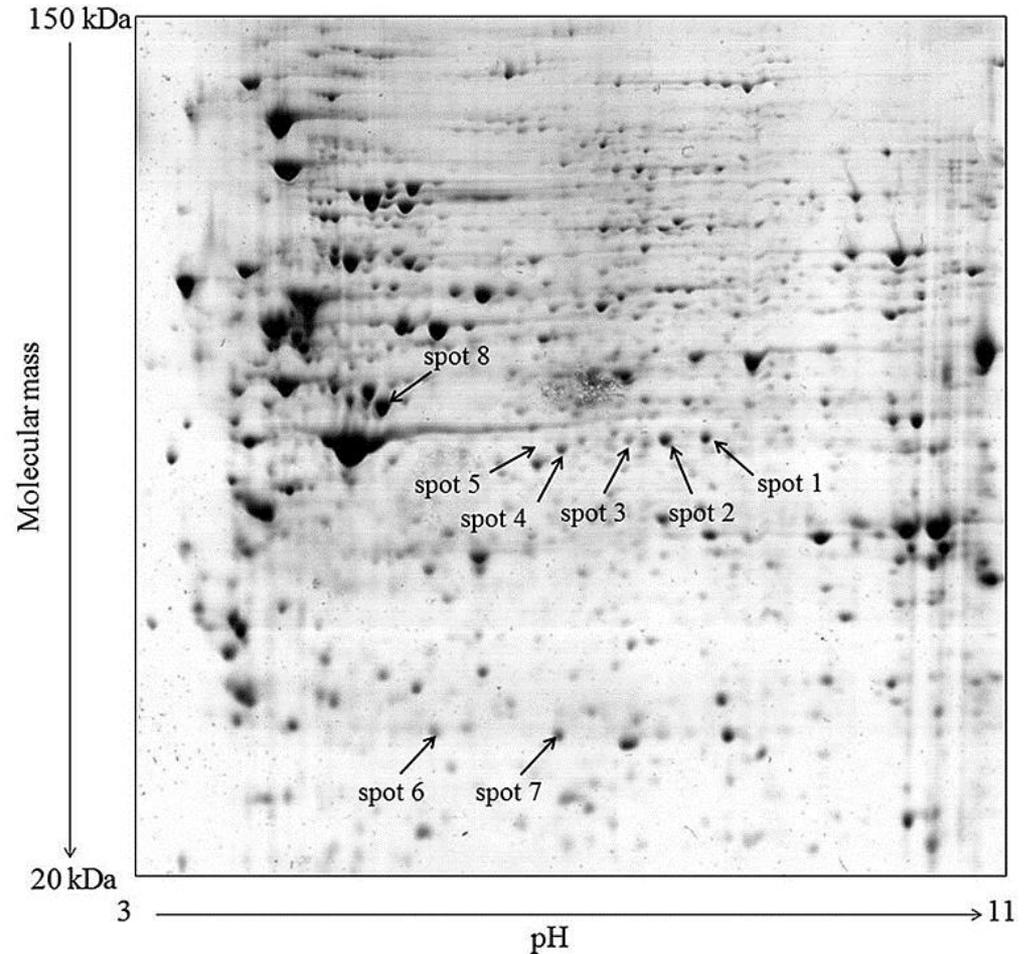
Esistono comunque tecniche HPTLC che usano fasi stazionarie particolari, es. con particelle di dimensioni inferiori.

La **cromatografia planare bidimensionale (2D-TLC)** migliora la separazione effettuando sulla stessa lastra due separazioni cromatografiche consecutive ortogonali fra di loro (le fasi mobili sono differenti per evitare che gli analiti migrino sempre alla stessa velocità).



# CROMATOGRAFIA SU STRATO SOTTILE (TLC)

Tecniche di cromatografia planare bidimensionale sono usate anche per frazionare estratti o lisati cellulari prima di una **analisi proteomica** (per identificare una proteina dalla sua sequenza amminoacidica è fondamentale partire da campioni relativamente puri). Le separazioni consecutive sono basate su processi elettroforetici e di solito differenziano le proteine in base a **punto isoelettrico e peso molecolare**.



Frazionamento mediante 2D-TLC delle proteine in un lisato cellulare (le proteine separate sono state rivelate con un reattivo generico per proteine)

## CROMATOGRAFIA PREPARATIVA SU COLONNA

Nella **cromatografia preparativa su colonna**, usata per semplici procedure di frazionamento o purificazione, il flusso di fase mobile viene ottenuto per gravità. Colonne per varie applicazioni possono essere preparate partendo dalla fase stazionaria o acquistate già pronte.



Colonna e fasi stazionarie per cromatografia preparativa



Colonna commerciale per cromatografia di esclusione dimensionale

Colonne commerciali per cromatografia di immunoaffinità

Riempimento di una colonna per cromatografia preparativa:

<https://www.youtube.com/watch?v=ItTtnVKcqDw>

## CROMATOGRAFIA PREPARATIVA SU COLONNA

Per separazioni lunghe e/o complesse si possono utilizzare pompe o altri sistemi di pressurizzazione (es. "flash-chromatography") per aumentare il flusso della fase mobile e raccoglitori automatici per recuperare le frazioni eluite.



Valvola per introdurre un gas inerte (es. azoto) che aumenta la pressione e incrementa il flusso della fase mobile



Raccoglitore automatico di frazioni

Colonna per cromatografia preparativa mediante "flash-chromatography"



Sistema per cromatografia preparativa in gradiente

# CROMATOGRAFIA LIQUIDA AD ALTA PRESTAZIONE (HPLC)

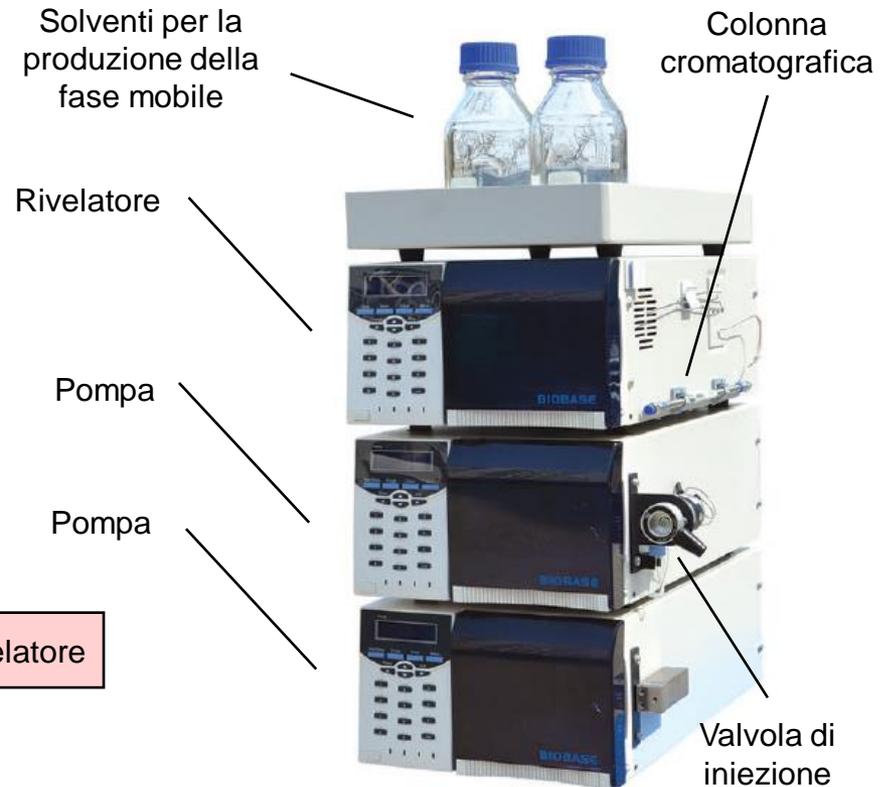
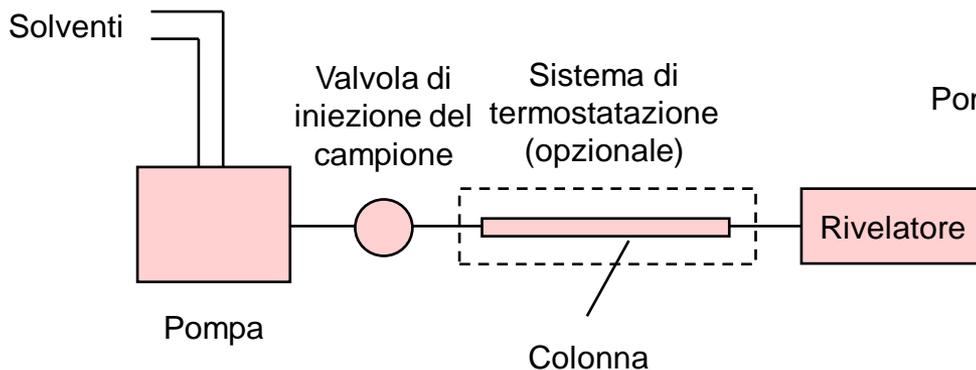
## Come è fatto un sistema per gascromatografia?

La **cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC)** è la tecnica di cromatografia liquida strumentale più usata per analisi quali-quantitative.

Un sistema HPLC impiega **pompe** per produrre il flusso di fase mobile. Il campione viene iniettato nella colonna con una **valvola di iniezione** ed i componenti separati vengono individuati da un **rivelatore** posto all'uscita della colonna.

Le analisi HPLC vengono in genere effettuate utilizzando **cromatografia di ripartizione in fase inversa**.

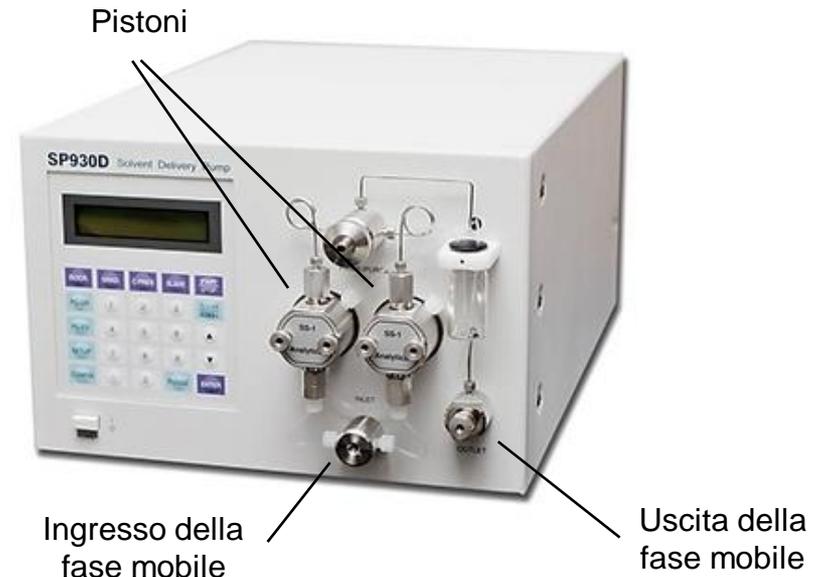
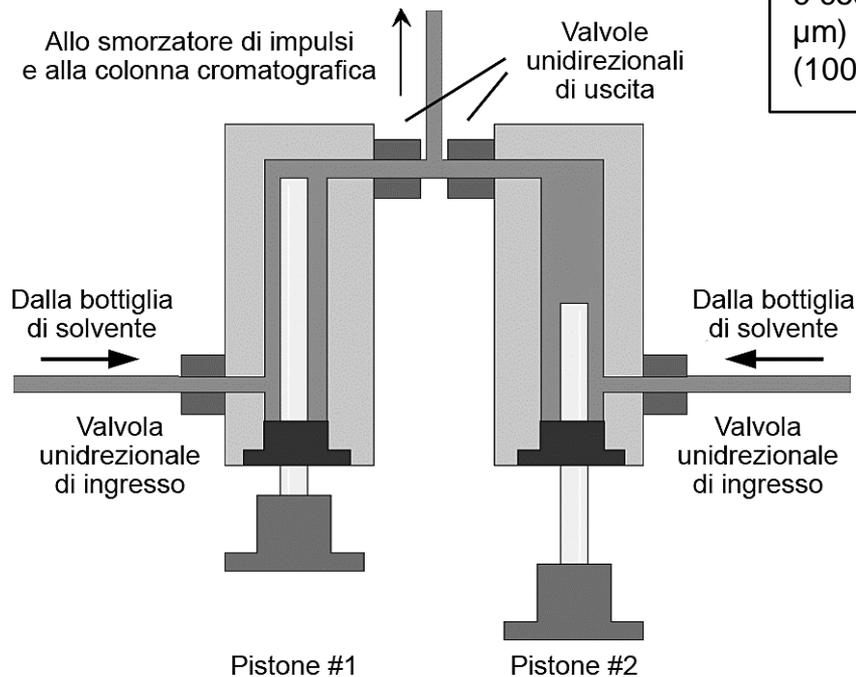
Questa tecnica è stata di recente superata dalle **tecniche UPLC**, basate su principi simili ma in grado di effettuare analisi molto più veloci.



## Pompe

Le più comuni pompe per HPLC sono **pompe reciprocanti a pistone** (esistono comunque anche altre configurazioni). Ogni pompa ha due pistoni che si muovono in direzioni opposte in camere con valvole unidirezionali di ingresso ed uscita in modo da garantire un flusso continuo (mentre un pistone invia la fase mobile l'altro è in aspirazione, poi al termine del ciclo le funzioni si invertono).

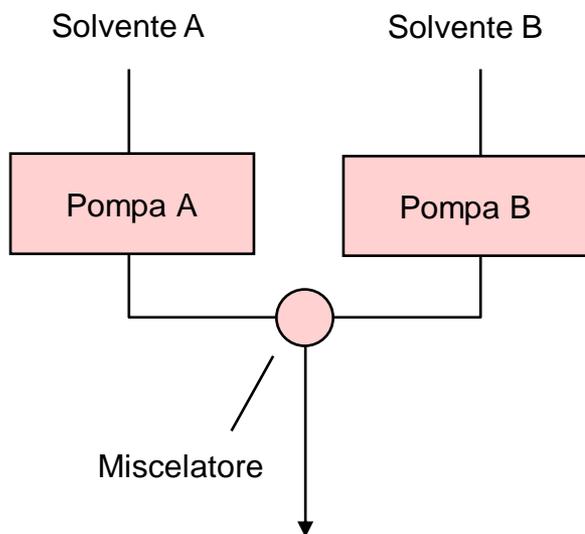
I flussi di fase mobile sono dell'ordine di 100 - 1000  $\mu\text{L}/\text{min}$  in base al diametro della colonna. Poiché la fase stazionaria nella colonna è costituita da particelle di piccole dimensioni (tipicamente 3 - 10  $\mu\text{m}$ ) per ottenere questi flussi sono richieste pressioni molto elevate (100 - 200 atmosfere ed oltre).



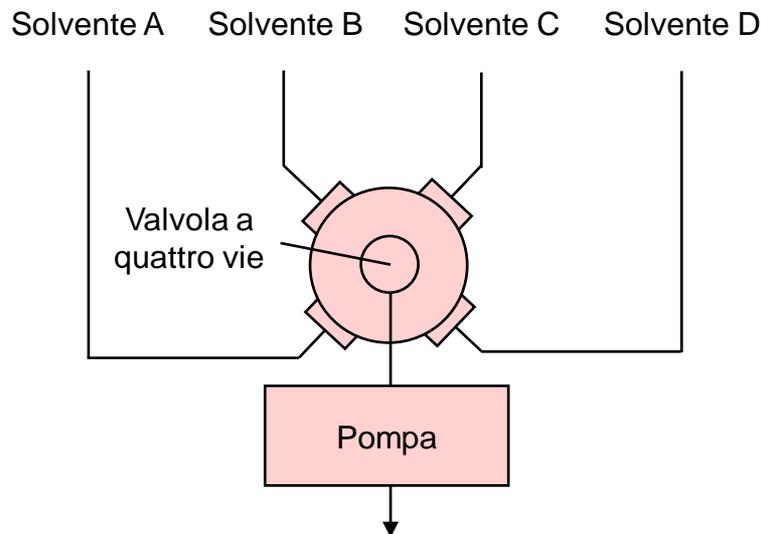
### *Come si genera un gradiente di eluizione?*

Un gradiente di eluizione viene generato miscelando nelle opportune proporzioni due (o più) solventi a diversa polarità.

La miscelazione può avvenire usando pompe separate per ogni solvente (***miscelazione ad alta pressione***, la composizione è controllata dalla velocità relativa delle pompe) o con una valvola a più vie collegata ad una sola pompa (***miscelazione a bassa pressione***, la composizione è controllata dai tempi di apertura della valvola).



Sistema per generazione di un gradiente mediante miscelazione ad alta pressione



Sistema per generazione di un gradiente mediante miscelazione a bassa pressione con valvola miscelatrice a quattro vie

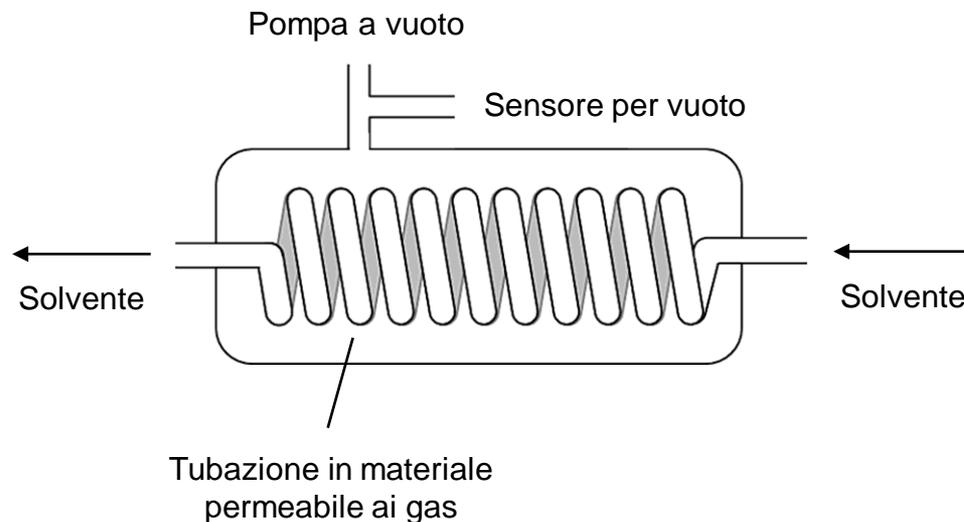
### ***Degassamento della fase mobile***

La miscelazione di acqua e solventi organici comporta variazioni nella solubilità dei gas atmosferici, che potrebbero portare alla formazione di bolle che perturbano il flusso della fase mobile. Molti strumenti integrano **sistemi di degassamento** che eliminano i gas disciolti nei solventi prima che giungano alla pompa.

Una procedura più semplice è quella di degassare i solventi nella bottiglia di prelievo facendovi gorgogliare un gas a bassa solubilità (es. elio).



Sistema di degassamento in linea della fase mobile con quattro canali indipendenti



### *Ottimizzazione della separazione cromatografica*

La **composizione della fase mobile** (oltre alla natura della fase stazionaria) è un fattore fondamentale nel determinare i tempi di ritenzione in HPLC e viene utilizzata per ottimizzare la separazione.

La temperatura ha poco effetto sui tempi di ritenzione. Le colonne HPLC possono comunque essere termostate per migliorare la riproducibilità di tempi di ritenzione e facilitare il raggiungimento dell'equilibrio fra fase mobile e fase stazionaria.

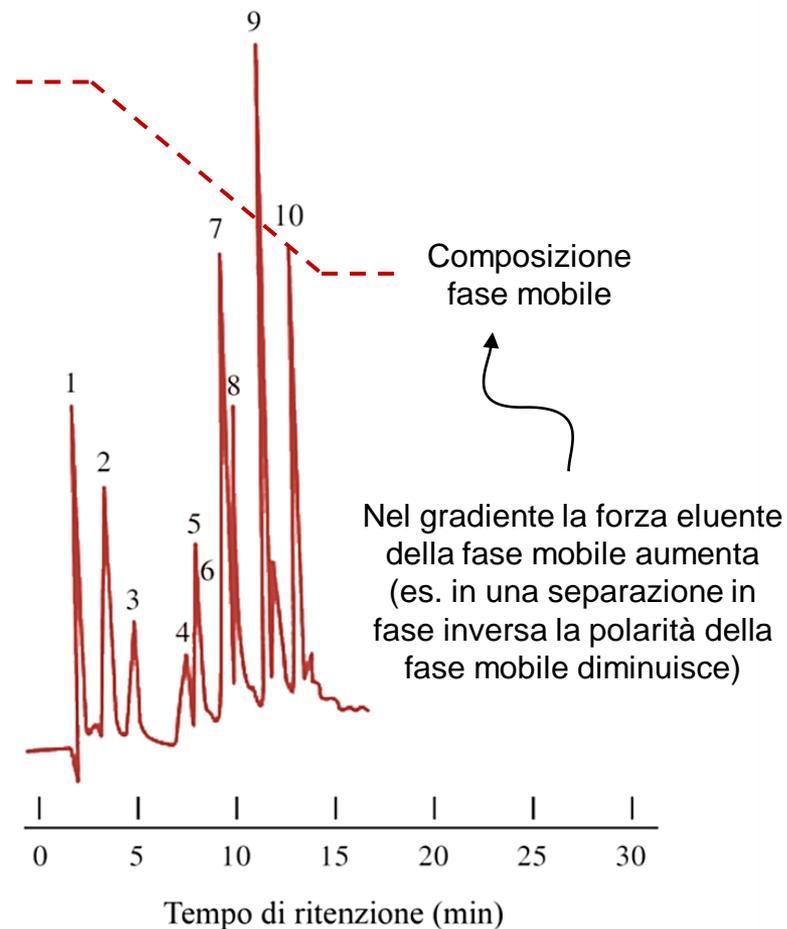
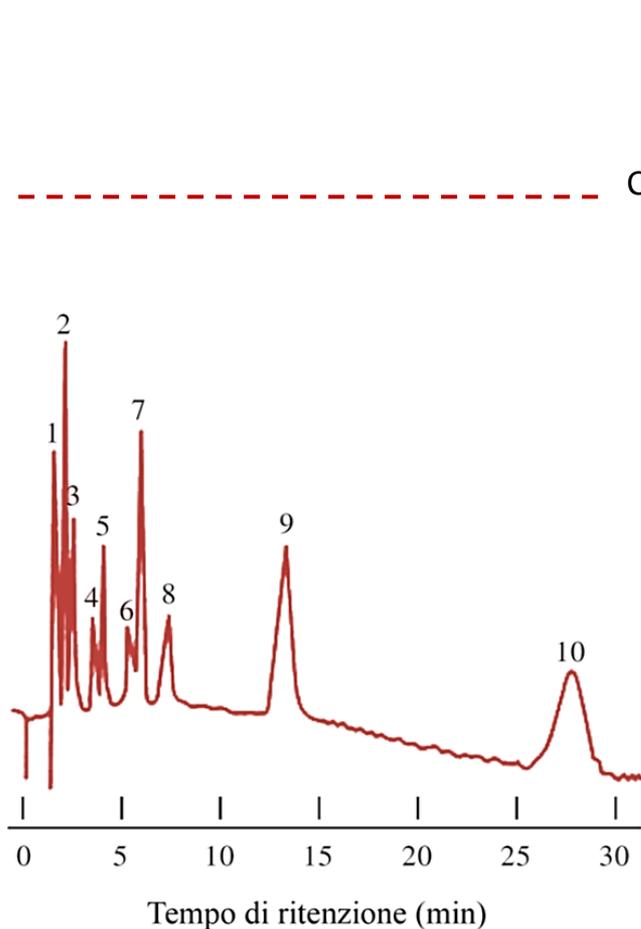
#### ***Eluizione isocratica***

La separazione cromatografica viene condotta con una fase mobile a composizione costante.

#### ***Eluizione a gradiente***

La composizione della fase mobile varia durante l'analisi per ottimizzare la separazione degli analiti.

Come in gascromatografia, questa modalità è indicata quando gli analiti nel campione hanno **proprietà molto diverse** e non è possibile individuare una condizione di compromesso accettabile.

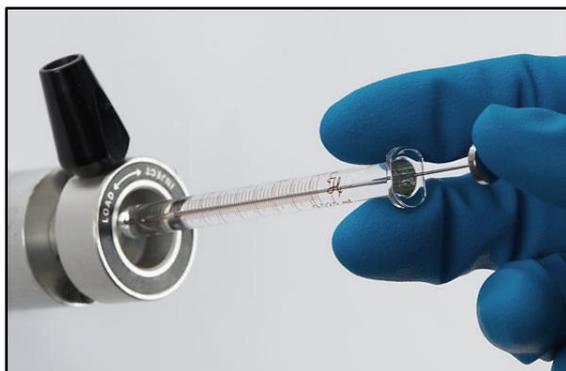
*Separazioni cromatografiche isocratiche e a gradiente*

### *Iniezione del campione*

Il campione da analizzare (come tale o in soluzione) viene iniettato in colonna attraverso una **valvole di iniezione** equipaggiata con un "loop". Sebbene il campione venga caricato nella valvola con una microsiringa, il volume effettivamente iniettato in colonna è quello contenuto nel "loop" montato sulla valvola.

Il volume trasferito con la siringa non è critico, ma deve comunque essere sufficiente a riempire il "loop".

Il "loop" (una piccola sezione di tubazione a volume esattamente noto) stabilisce il volume di campione iniettato in colonna



Caricamento del campione nella valvola di iniezione mediante una microsiringa

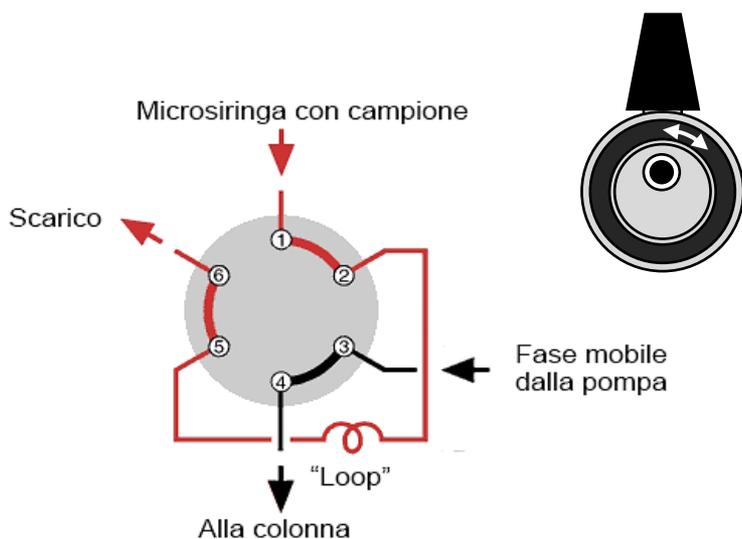


"Loop" con differenti volumi

Sostituzione del "loop" in una valvola di iniezione:  
<https://www.youtube.com/watch?v=pgg6QUn3Y-8>

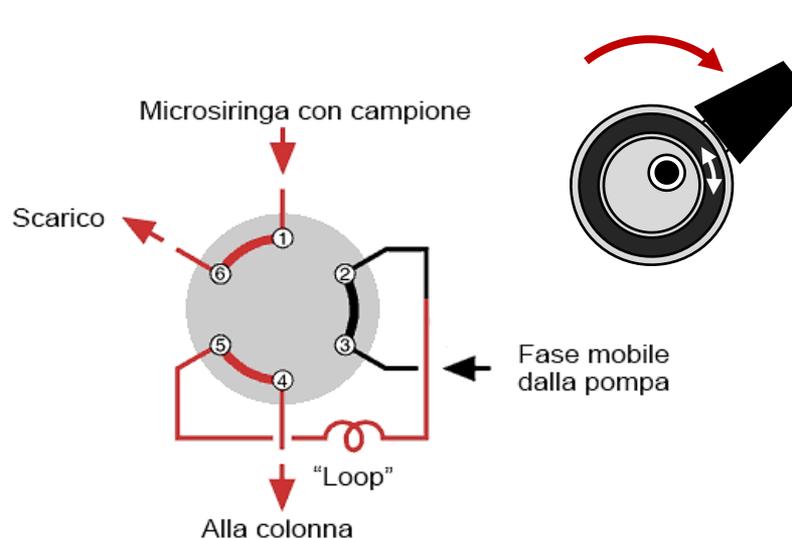
# CROMATOGRAFIA LIQUIDA AD ALTA PRESTAZIONE (HPLC)

La valvola di iniezione permette di effettuare l'iniezione del campione senza interrompere il flusso della fase mobile e quindi alterare gli equilibri nella colonna cromatografica (l'iniezione diretta in flusso non è possibile per le elevati pressioni presenti nel sistema).



### **Caricamento del campione**

La fase mobile in pressione passa dalla pompa alla colonna attraversando la valvola, mentre il "loop" è disconnesso e a pressione ambiente, pertanto può essere riempito facilmente



### **Iniezione del campione**

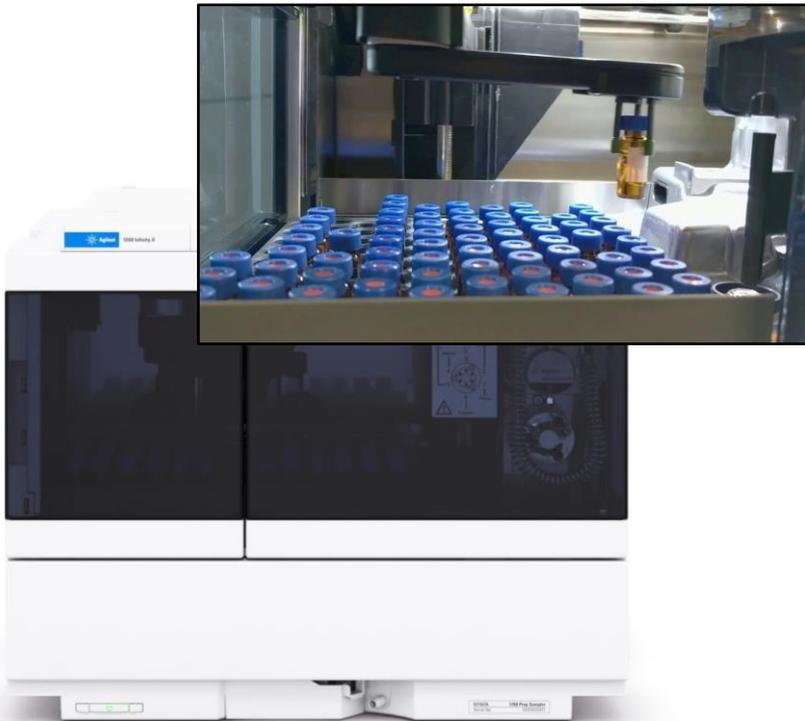
Il "loop" viene inserito nella linea in pressione dalla pompa alla colonna ed il campione caricato viene trascinato in colonna (di solito questa operazione avvia in automatico la registrazione del cromatogramma)

Iniezione manuale del campione in HPLC:  
<https://www.youtube.com/watch?v=xH8KpxOd1w4>

## CROMATOGRAFIA LIQUIDA AD ALTA PRESTAZIONE (HPLC)

Come per la gascromatografia, anche per i sistemi HPLC esistono **autocampionatori** in grado di automatizzare le procedure di analisi.

A differenza delle valvole di iniezione manuali gli autocampionatori utilizzano siringhe per dosare il campione, quindi il volume iniettato può essere variato arbitrariamente.

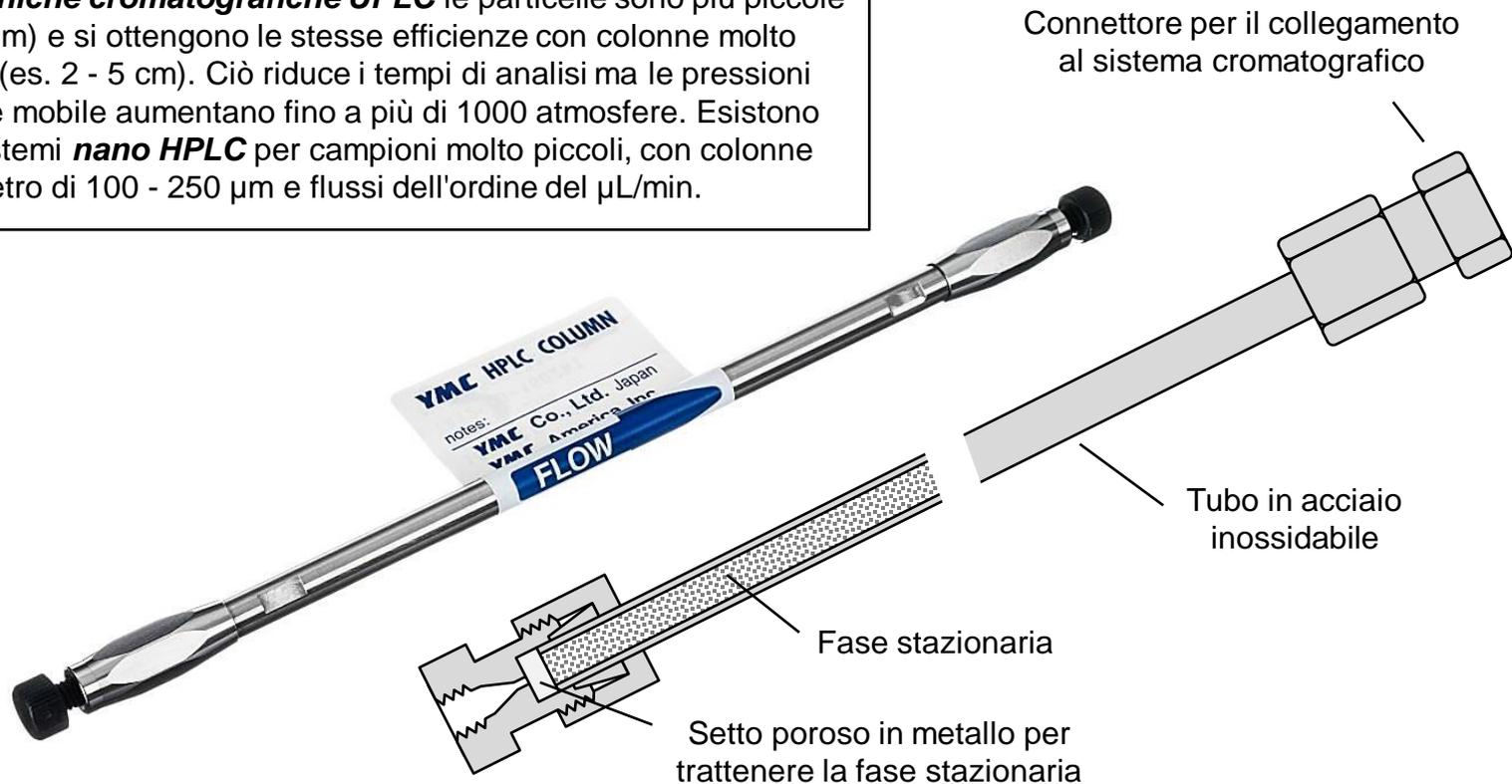


# CROMATOGRAFIA LIQUIDA AD ALTA PRESTAZIONE (HPLC)

## Colonne per HPLC

Si usano **colonne impaccate** relativamente corte (10 - 25 cm) con diametro interno di qualche millimetro (tipicamente 2 - 5 mm). La fase stazionaria consiste in particelle di piccole dimensioni (3 - 10  $\mu\text{m}$ ) che permettono di ottenere una elevata efficienza (una colonna può avere da qualche migliaio a 15000 - 20000 piatti teorici).

Nelle **tecniche cromatografiche UPLC** le particelle sono più piccole (sotto 2  $\mu\text{m}$ ) e si ottengono le stesse efficienze con colonne molto più corte (es. 2 - 5 cm). Ciò riduce i tempi di analisi ma le pressioni della fase mobile aumentano fino a più di 1000 atmosfere. Esistono anche sistemi **nano HPLC** per campioni molto piccoli, con colonne del diametro di 100 - 250  $\mu\text{m}$  e flussi dell'ordine del  $\mu\text{L}/\text{min}$ .



# CROMATOGRAFIA LIQUIDA AD ALTA PRESTAZIONE (HPLC)

Prima della colonna principale viene spesso installata una corta **colonna di guardia** con la stessa fase stazionaria della colonna principale. La sua funzione è quella di proteggere quest'ultima trattenendo le sostanze in grado di legarsi irreversibilmente alla fase stazionaria.

Una colonna cromatografica HPLC con fase stazionaria silice-C<sub>18</sub> (uno dei tipi più utilizzati) ha un prezzo di 500 - 1500€ in funzione della sua lunghezza. Con la stessa cifra si acquistano 10 - 20 cartucce silice-C<sub>18</sub> per una colonna di guardia, alle quali va aggiunto un "holder" riutilizzabile (100 - 200€).



Colonne di guardia con cartucce intercambiabili



Colonna di guardia convenzionale

**Rivelatori**

Le caratteristiche di un rivelatore ideale per HPLC (sensibilità, ampio spettro di analiti identificabili, risposta quantitativa, ecc.) sono simili a quelle richieste in gascromatografia.

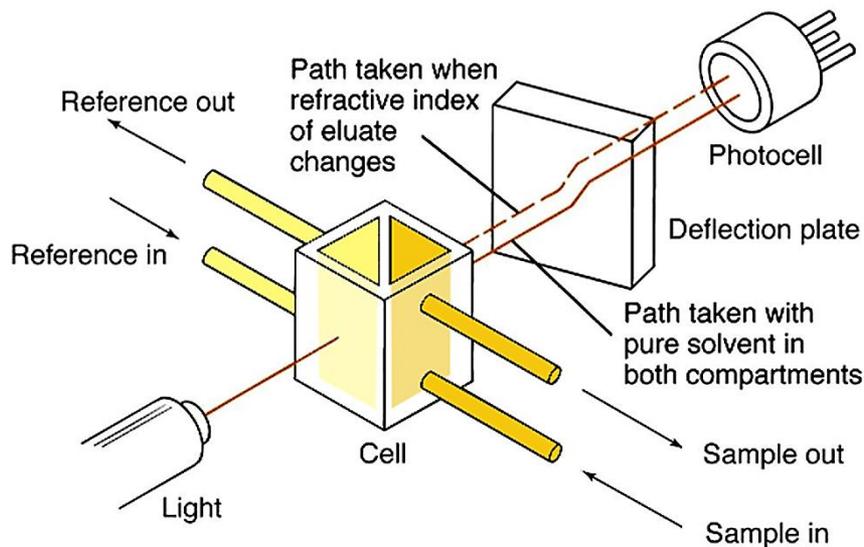
In aggiunta deve avere un **piccolo volume** (non più di qualche  $\mu\text{L}$ ) in modo da non causare significativi allargamenti di banda durante la rivelazione.

HPLC Detector	Mass LOD (Typical)	Linear Range (Decades)
Absorbance	10 pg	3–4
Fluorescence	10 fg	5
Electrochemical	100 pg	4–5
Refractive index	1 ng	3
Conductivity	100 pg–1 ng	5
Mass spectrometry	< 1 pg	5
FTIR	1 $\mu\text{g}$	3
Light scattering	1 $\mu\text{g}$	5
Optical activity	1 ng	4
Element selective	1 ng	4–5
Photoionization	< 1 pg	4

# CROMATOGRAFIA LIQUIDA AD ALTA PRESTAZIONE (HPLC)

Il **rivelatore a indice di rifrazione** misura l'indice di rifrazione della fase mobile. Poiché le variazioni dovute alla presenza di analiti sono piccole e l'indice di rifrazione è influenzato anche da altri fattori (es. temperatura) le celle di misura sono spesso termostatate e/o costruite per comparare gli indici di rifrazione della fase mobile in ingresso e in uscita dalla colonna.

Questo rivelatore risponde a **tutti gli analiti** (rileva variazioni di densità) ed è usato per composti che non assorbono nell'UV-Vis (es. idrocarburi saturi, alcoli, zuccheri). La sua limitazione principale è la **scarsa sensibilità**.

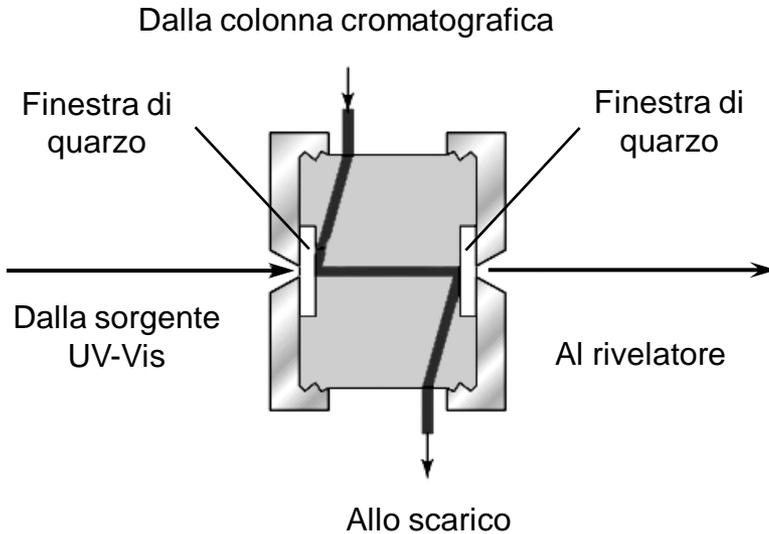


Rivelatore ad indice di rifrazione basato sul confronto delle fasi mobili in ingresso e in uscita dalla colonna cromatografica

# CROMATOGRAFIA LIQUIDA AD ALTA PRESTAZIONE (HPLC)

I **rivelatori spettrofotometrici** sono fra i rivelatori più utilizzati in HPLC. Un rivelatore spettrofotometrico è simile a uno spettrofotometro convenzionale ma impiega una **cella a flusso** dotata di finestre di quarzo per potere effettuare misure anche nel campo dell'UV.

Questo rivelatore risponde alle sostanze con **assorbimento nell'UV-Vis**. E' fondamentale tenere conto delle finestre spettrali di trasparenza dei solventi contenuti nella fase mobile perché con le sostanze organiche si opera quasi sempre nell'UV.



Le celle sono disegnate per avere cammini ottici ragionevoli (es. 0,5 - 1 cm) ma volumi piccoli (poche  $\mu\text{L}$ ) per dare buoni valori di assorbanza senza causare un allargamento significativo delle bande cromatografiche.



Cella a flusso per rivelatore spettrofotometrico per HPLC (cammino ottico 0,5 cm)

## CROMATOGRAFIA LIQUIDA AD ALTA PRESTAZIONE (HPLC)

I rivelatori spettrofotometrici più semplici effettuano misure a una singola lunghezza d'onda, fissa (es. una sorgente con lampada a mercurio ha una intensa riga a 254 nm, adatta alla maggior parte dei composti organici) o selezionabile con un monocromatore da una sorgente a spettro continuo (es. una lampada a deuterio).

I rivelatori che usano sorgenti continue sono più versatili in quanto permettono di selezionare per ogni analita la lunghezza d'onda ottimale.



La maggior parte dei rivelatori adotta configurazioni a singolo raggio (l'azzeramento viene effettuato all'inizio di ogni analisi, ma questo può comportare una deriva della linea di base nell'eseparazioni cromatografiche in gradiente di eluizione)

# CROMATOGRAFIA LIQUIDA AD ALTA PRESTAZIONE (HPLC)

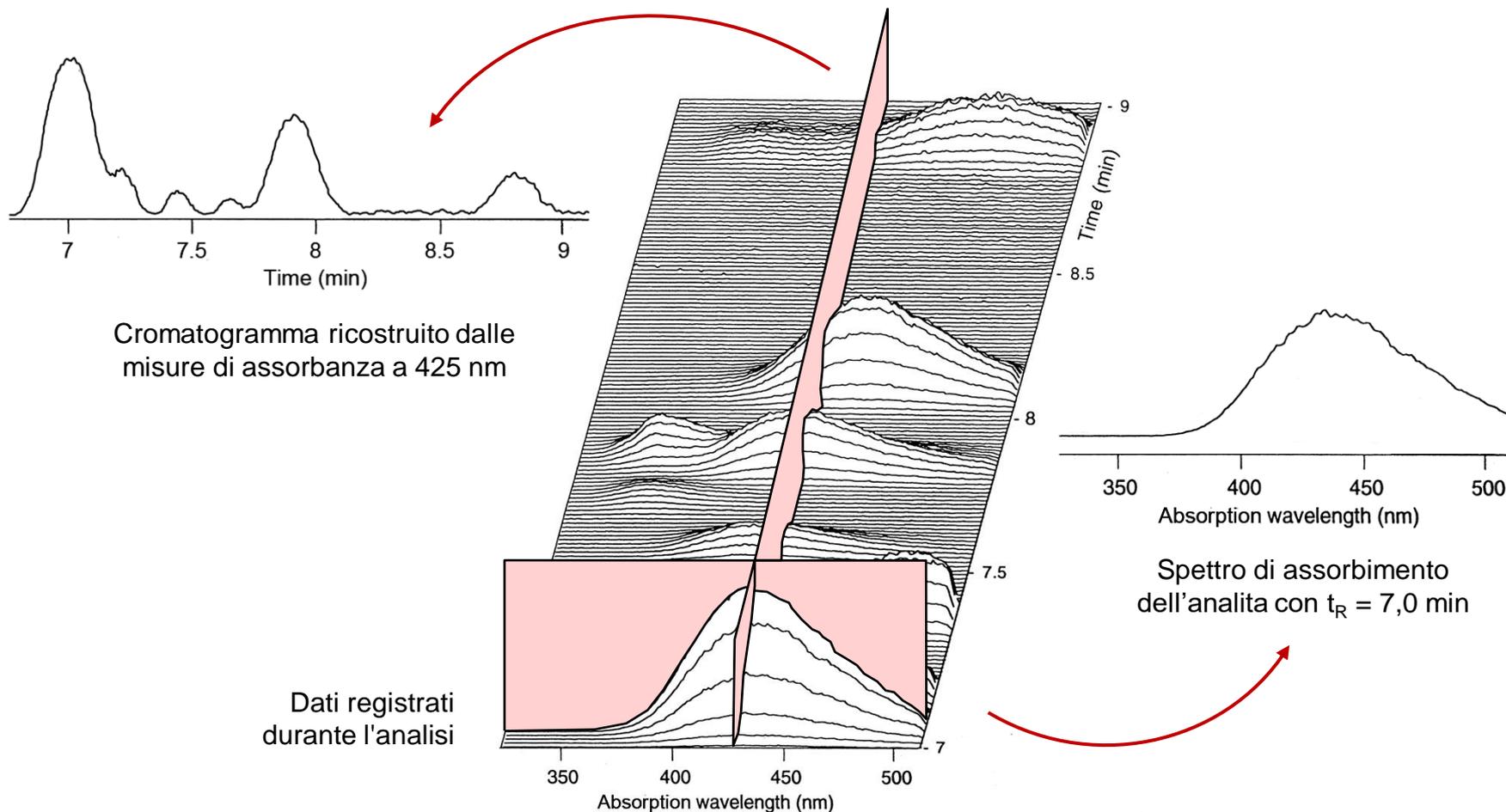
Il **rivelatore spettrofotometrico a matrice di diodi** misura in tempo reale lo spettro di assorbimento della fase mobile in uscita dalla colonna e consente di rivelare ogni analita alla sua lunghezza d'onda ottimale. Può avere una sola sorgente (es. una lampada a deuterio) o una coppia di sorgenti (es. lampade a deuterio e a tungsteno).

Questo tipo di rivelatore è il rivelatore spettrofotometrico più utilizzato in HPLC.

Sebbene lo spettro di assorbimento UV-visibile spesso non permetta un'identificazione certa, con questi rivelatori è possibile usare **database di spettri di assorbimento** per ottenere informazioni sulla possibile natura degli analiti.



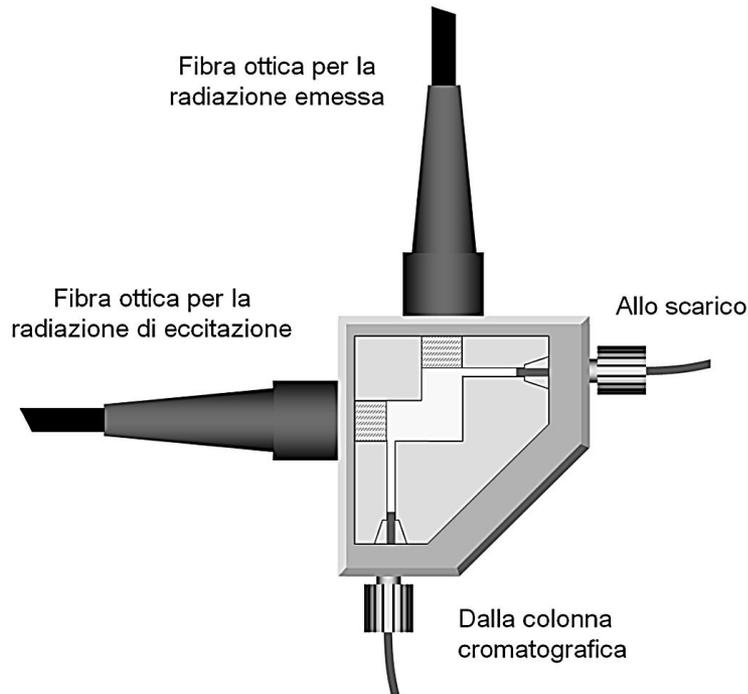
I dati ottenuti con questo rivelatore possono essere soggetti a vari tipi di elaborazione, anche successivamente alla analisi cromatografica (es. si possono generare cromatogrammi a diverse lunghezze d'onda per ricercare nuovi composti).



## CROMATOGRAFIA LIQUIDA AD ALTA PRESTAZIONE (HPLC)

Un **rivelatore a fluorescenza** è fondamentalmente uno spettrofluorimetro equipaggiato con una cella a flusso per misure di fluorescenza.

È un rivelatore **molto sensibile**, ma risponde soltanto ad analiti fluorescenti. Per aumentarne l'applicabilità gli analiti possono essere marcati con specie fluorescenti (esistono anche sistemi di derivatizzazione post-colonna nei quali i reattivi vengono aggiunti all'eluato in uscita dalla colonna).



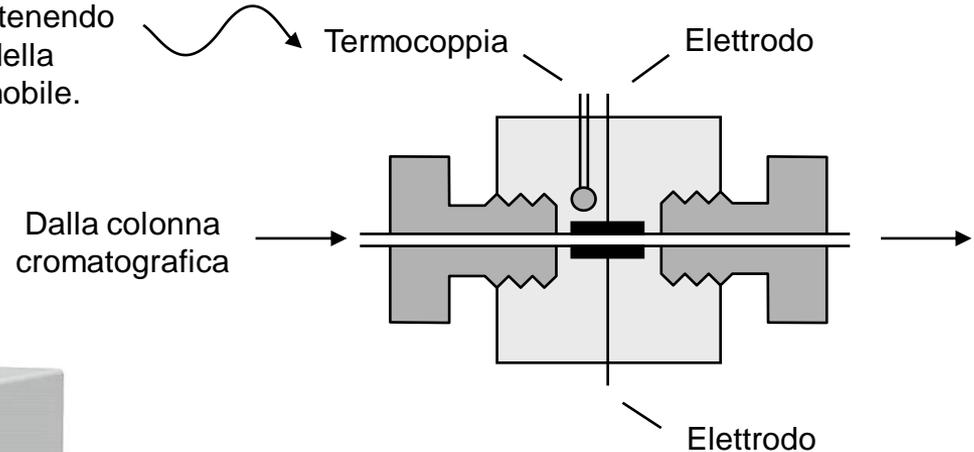
Cella per un rivelatore a fluorescenza con un sistema di irradiazione del campione e raccolta della emissione di fluorescenza basato su fibre ottiche



## CROMATOGRAFIA LIQUIDA AD ALTA PRESTAZIONE (HPLC)

Il **rivelatore a conducibilità** è utilizzato per individuare ioni, es. in cromatografia ionica. Registra qualsiasi specie carica anche se la risposta varia in base alle sue caratteristiche (es. carica, mobilità ionica) e alle condizioni sperimentali (es. grado di dissociazione se lo ione rivelato proviene da un elettrolita debole).

La termocoppia permette di correggere la conducibilità tenendo conto delle variazioni della temperatura della fase mobile.



Cella di misura di un rivelatore a conducibilità



Le tecniche di spettrometria di massa vengono sempre più utilizzate come tecniche di rivelazione in gascromatografia ed HPLC.

## ***Applicabilità a qualsiasi analita***

L'unica richiesta è la possibilità di ottenerlo in forma ionizzata.

## ***Compatibilità con qualsiasi tecnica cromatografica***

## ***Alta selettività***

E' possibile ***identificare gli analiti*** (es. dalla massa molecolare o dallo spettro di frammentazione) anche senza l'uso di standard. Poiché viene misurata la massa molecolare. Questa tecnica di rivelazione permette l'uso di ***molecole marcate con isotopi stabili*** come standard interno.

Con la spettrometria di massa la capacità separativa del sistema cromatografico non è più un limite ed è possibile identificare e quantificare analiti ***coeluiti*** (cioè non separati dal sistema cromatografico).

## ***Alta sensibilità***

I limiti di rivelabilità sono comparabili o migliori di quelli di altre tecniche di rivelazione.

## ***Come si accoppia un sistema cromatografico con un spettrometro di massa?***

L'impiego della spettrometria di massa richiede una ***sorgente di ionizzazione*** che ionizza l'analita e lo trasferisce nell'ambiente in alto vuoto dello spettrometro di massa impedendo nel contempo l'ingresso di quantità elevate di gas e/o vapori di fase mobile (nel caso della cromatografia liquida).

***Sorgente ad impatto elettronico***

***Sorgente a ionizzazione chimica***

Impiegate per l'accoppiamento con sistemi gascromatografici.

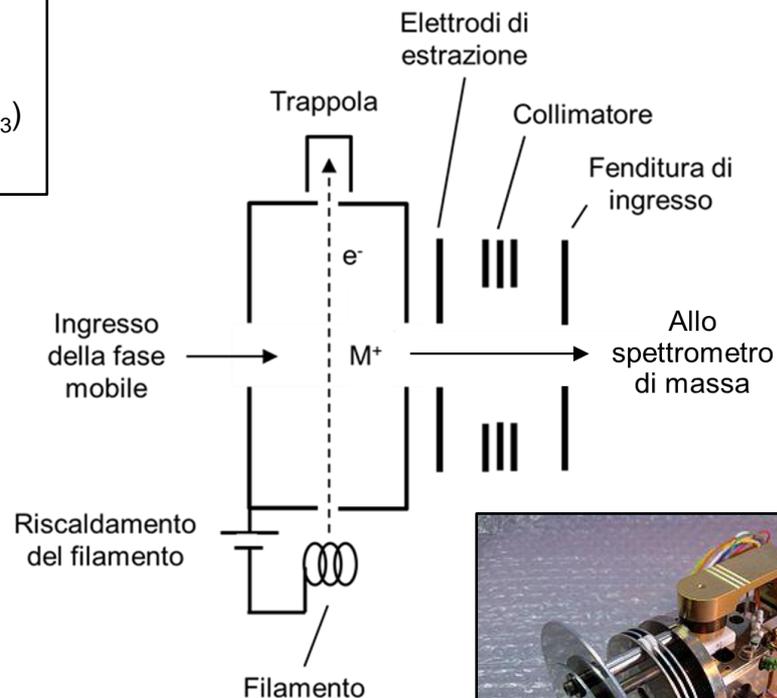
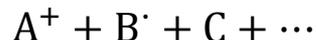
***Sorgente di ionizzazione elettrospray***

***Sorgente di ionizzazione chimica a pressione atmosferica***

Impiegate per l'accoppiamento con sistemi di cromatografia liquida (HPLC, UPLC).

Nella **sorgente di ionizzazione a impatto elettronico (EI)** la fase mobile gassosa in uscita dalla colonna viene bombardata con elettroni accelerati (50 -100 eV). La collisione degli elettroni con le molecole dell'analita genera ioni positivi che spesso (per instabilità intrinseca o per l'elevata energia ceduta dalla collisione) subiscono una successiva frammentazione.

Questa è una **sorgente di ionizzazione "hard"** (si possono verificare processi di frammentazione che impediscono la individuazione dello ione molecolare). La frammentazione è inferiore nella **sorgente a ionizzazione chimica**, dove la ionizzazione è mediata da una specie gassosa (es. CH<sub>4</sub>, NH<sub>3</sub>) introdotta in sorgente.

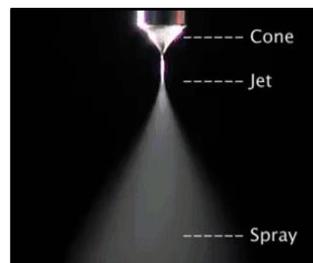
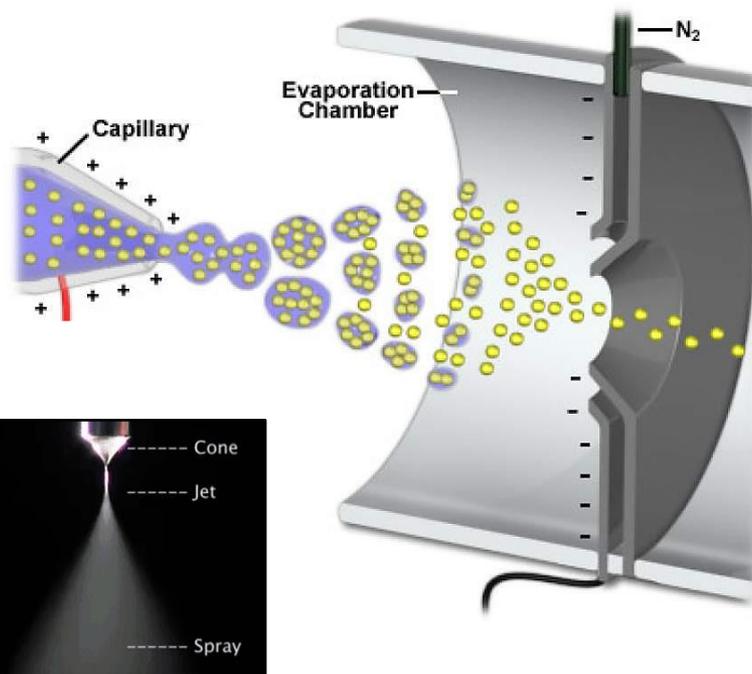


Nella **sorgente di ionizzazione elettrospray (ESI)** la fase mobile liquida in uscita dalla colonna viene nebulizzata da un ago mantenuto ad un elevato potenziale (2000 - 4000 V, il segno dipende dalla carica degli ioni che si vogliono produrre). L'aerosol carico ottenuto evapora in un flusso di gas inerte caldo (200 - 300°C) rilasciando in fase gassosa gli analiti ionizzati, che vengono trasferiti nello spettrometro di massa.

Questa è una **sorgente di ionizzazione "soft"** (non si verifica frammentazione degli analiti). Una sorgente correlata è la **sorgente di ionizzazione chimica a pressione atmosferica** dove la carica viene trasferita alle molecole di analita da un ago carico elettricamente. Se la fase mobile contiene acidi, basi o tamponi è necessario usare **sostanze volatili** (es.  $\text{CF}_3\text{COOH}$ ,  $\text{NH}_3$ ,  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ ), in modo che possano essere eliminate assieme ai vapori della fase mobile.



Sorgente ESI



Aerosol prodotto in una sorgente ESI

# CROMATOGRAFIA

## SOMMARIO

- **Tipi di cromatografia**  
Classificazione delle tecniche cromatografiche, formati cromatografici e meccanismi di ripartizione
- **Teoria della separazione cromatografica**  
Separazione degli analiti, costante di ripartizione, cromatogramma, tempo di ritenzione, analisi qualitativa e quantitativa, risoluzione, selettività, efficienza di una separazione cromatografica, allargamento di banda, ottimizzazione di una separazione cromatografica
- **Gas Cromatografia**  
Tipi di gas cromatografia (gas-solido e gas-liquido), fasi stazionarie ed applicazioni, strumentazione (gas di trasporto, sistema di iniezione, colonne gas cromatografiche, rivelatori), ottimizzazione di una separazione gas cromatografica (gas cromatografia isoterma e con programmazione della temperatura)
- **Cromatografia liquida**  
Tipi di cromatografia liquida (adsorbimento, ripartizione, scambio ionico, esclusione dimensionale, affinità), fasi stazionarie ed applicazioni, cromatografia planare (TLC), cromatografia preparativa su colonna, cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC), strumentazione (fase mobile, pompe, sistema di iniezione, colonne cromatografiche, rivelatori)
- **Cromatografia e spettrometria di massa**