

CROMATOGRAFIA

Definizioni

La cromatografia è una tecnica che permette di **separare** ed **analizzare** (sia per scopi **qualitativi** che **quantitativi**) miscele incognite liquide o gassose.

Tutte le tecniche cromatografiche sono caratterizzate dalla presenza di una **fase mobile** che spinge gli analiti "in avanti" nel mezzo cromatografico, a velocità costante, e da una **fase stazionaria** che li rallenta in modo selettivo.

Le due fasi devono essere tra loro **immiscibili**: la **fase stazionaria** può essere solida o liquida mentre la **fase mobile** può essere liquida o gassosa.

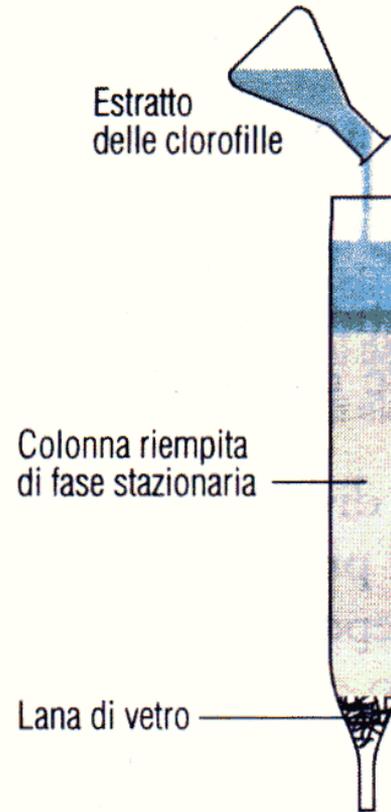
La separazione dei componenti della miscela avviene a causa della diversa affinità che gli analiti hanno per le due fasi.

Nascita della cromatografia

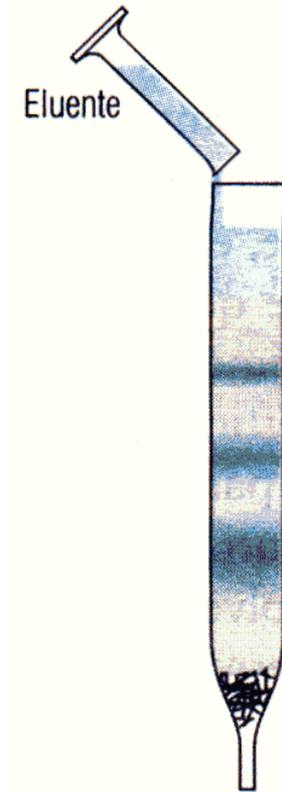
Michail Semenovitch Tswett
(1872-1919),
botanico russo, studioso dei
pigmenti vegetali



Esperimento
fondamentale



Fase 1: il campione
viene "caricato" in
testa alla colonna



Fase 2: il campione viene
"eluito" nella colonna
finché i componenti
escono separati

Meccanismo di eluizione e raccolta frazioni



Classificazione delle tecniche cromatografiche

1. Apparato strumentale

- cromatografia planare o su strato sottile (TLC)
- cromatografia su colonna

2. Stato fisico delle due fasi

- cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC)
- Gascromatografia (GC)

3. Meccanismo di ritenzione

- adsorbimento
- ripartizione
- scambio ionico
- esclusione
- affinità
- su fase chirale

2. Scopo

- Cromatografia analitica
- Cromatografia preparativa

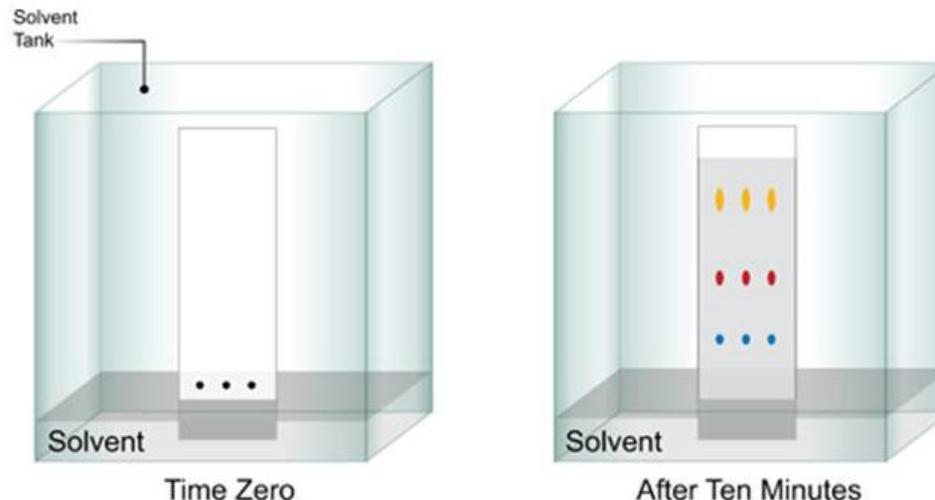
Cromatografia planare (TLC)

TLC (Thin Layer Chromatography): cromatografia planare

Tecnica cromatografica in cui la fase stazionaria è una **lastra di silice** (o allumina) depositata su uno strato di alluminio o vetro.

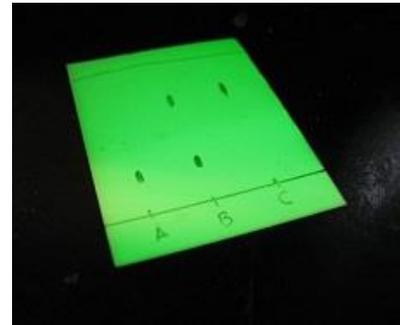
La fase mobile è costituita da una miscela di **solventi organici apolari** che migrano lungo la lastra.

La miscela da separare è **depositata** sulla lastra ed è immersa nella fase mobile all'interno della camera di sviluppo.

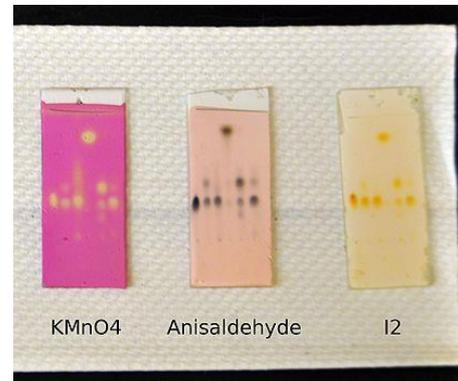
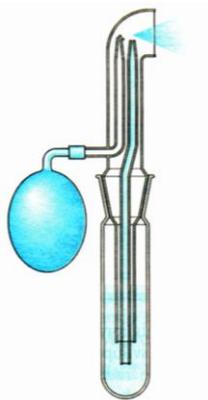


TLC: rivelazione

Lampada UV (se gli analiti sono cromofori)



Con reagenti chimici



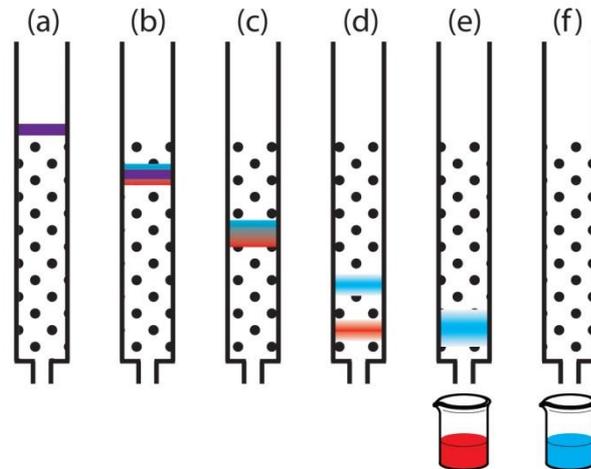
Cromatografia su colonna

Come avviene la separazione

La **fase stazionaria** è posta all'interno di una colonna.

La **fase mobile** viene fatta fluire continuamente attraverso la fase stazionaria mediante un sistema di pompe.

Essa può essere un gas (**gascromatografia**) o un liquido (**cromatografia liquida**).

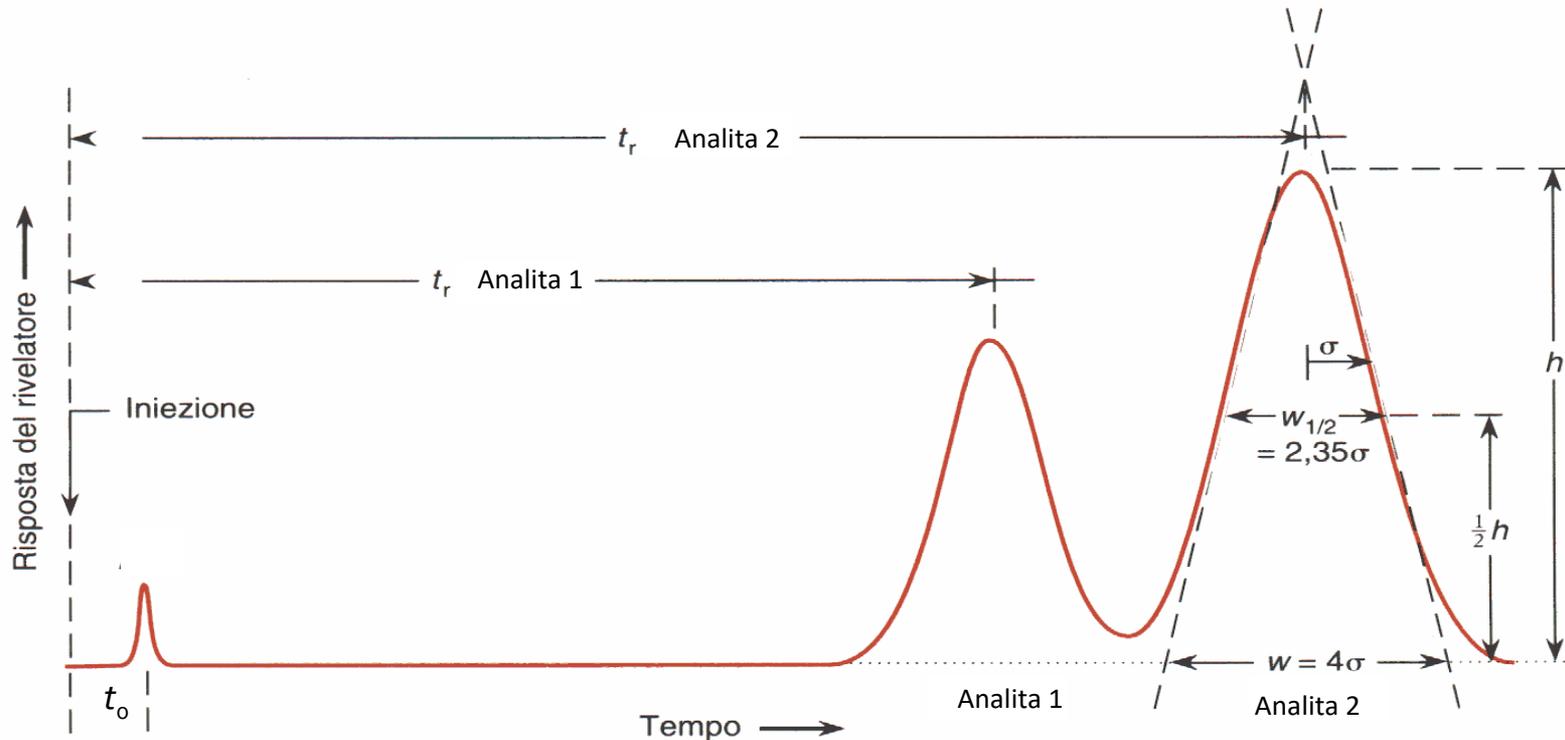


Un **rivelatore** posto dopo la colonna consente di un segnale elettrico ad ogni variazione della composizione della fase mobile (dovuto alla presenza degli analiti) che viene visualizzato su un computer interfacciato allo strumento.

Cromatogramma

Il **cromatogramma** è un grafico in cui si riporta in ordinata la variazione del segnale del rivelatore al passaggio degli analiti in funzione del tempo.

Il cromatogramma è composto dalla **linea di base** (cioè il segnale della fase mobile in assenza di campione) e dai **picchi cromatografici** dovuti agli analiti che escono dalla colonna.



Parametri cromatografici importanti

Ritenzione: è la capacità del sistema cromatografico di trattenere gli analiti presenti nel campione. Si ricava dalla posizione dei picchi nel cromatogramma.

Selettività: è la capacità del sistema cromatografico di separare due analiti presenti nel campione. Si ricava dalla distanza dei picchi corrispondenti ai due analiti, nel cromatogramma.

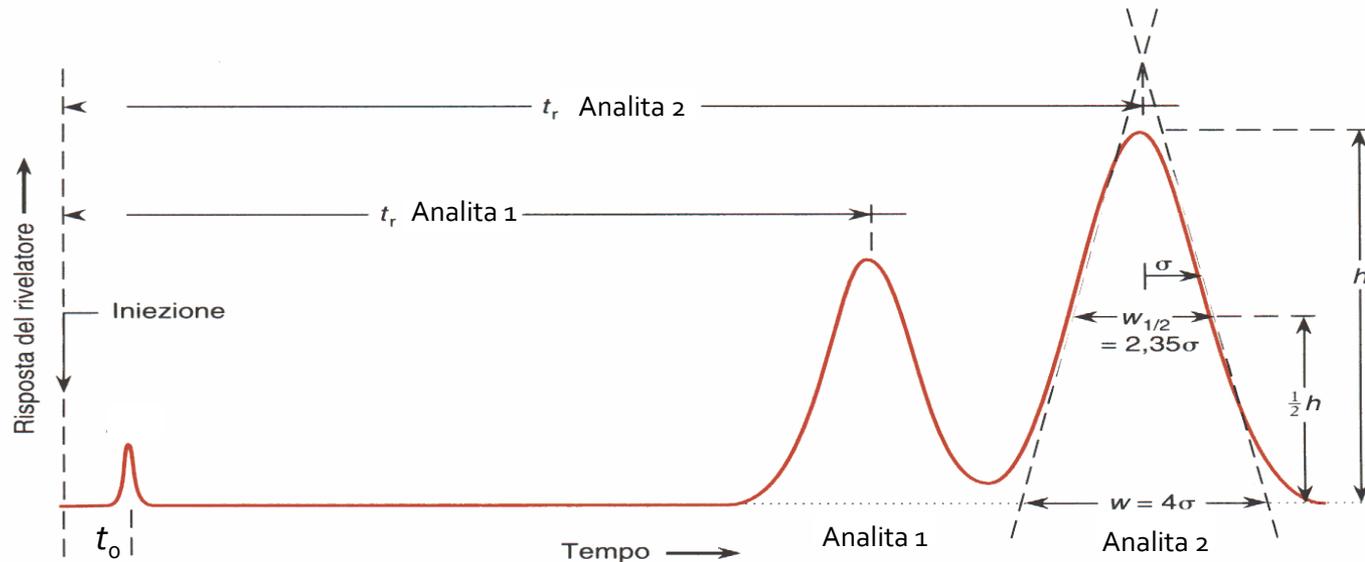
Efficienza: è la capacità del sistema cromatografico di eluire gli analiti come bande compatte (strette). Si ricava dalla larghezza dei picchi nel cromatogramma.

Ritenzione

t_R = **tempo di ritenzione**: tempo trascorso dall'iniezione del campione all'uscita del picco.

t_0 = **tempo morto**: tempo trascorso dall'iniezione del campione all'uscita del solvente o di un soluto non trattenuto dalla fase stazionaria. È una misura del volume vuoto in colonna.

$$k' = \text{fattore di ritenzione} = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

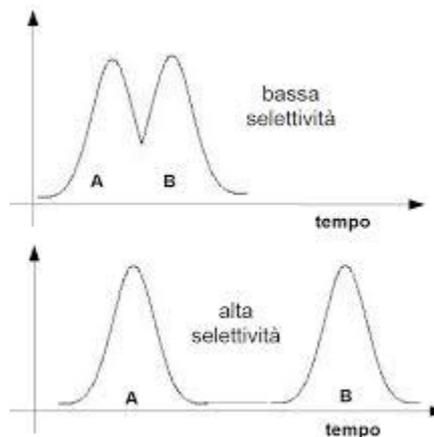


Selettività

È la capacità del sistema cromatografico di separare due analiti presenti nel campione. Si misura per mezzo del **coefficiente di selettività α** , definito come il rapporto dei fattori di ritenzione relativi a due picchi A e B:

$$\alpha = \frac{k'_B}{k'_A}$$

Il coefficiente di selettività è una grandezza adimensionale ed è sempre maggiore o uguale a 1.



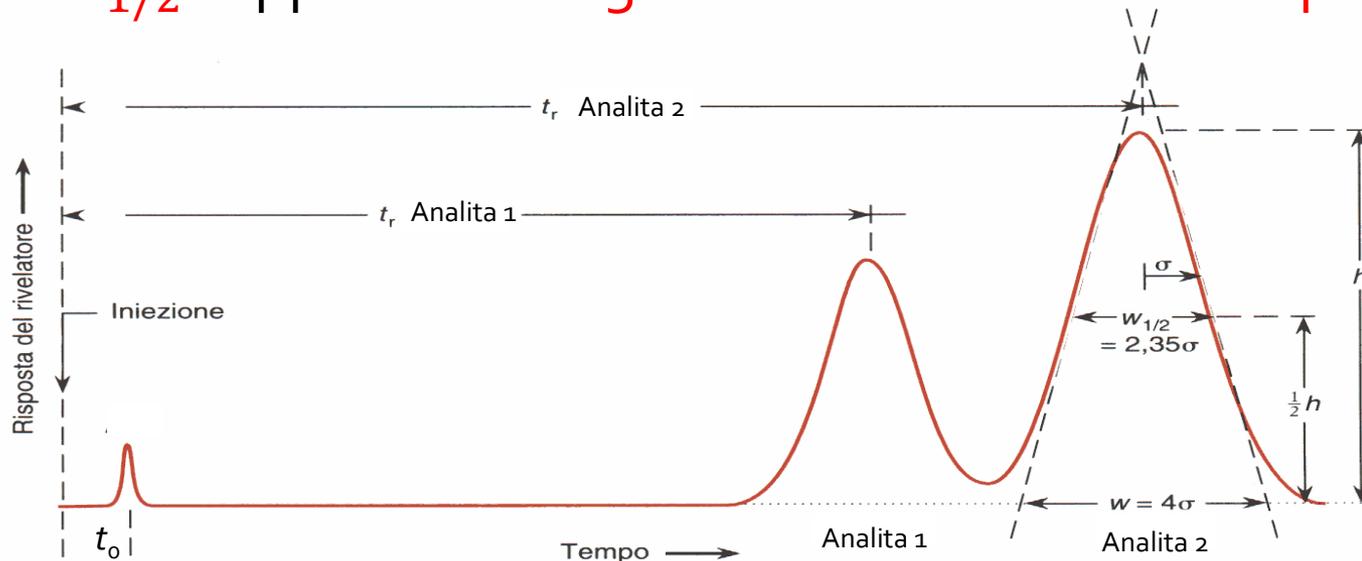
Efficienza

È la capacità del sistema cromatografico di eluire gli analiti come bande strette. Si misura in termini di **numero di piatti teorici (N)** o **altezza del piatto teorico (H)**.*

$$N = 5.54 \left(\frac{t_R}{w_{1/2}} \right)^2$$

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

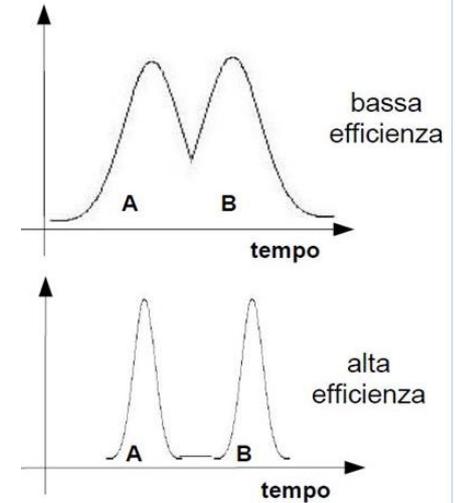
Dove $w_{1/2}$ rappresenta **larghezza a metà altezza del picco**.



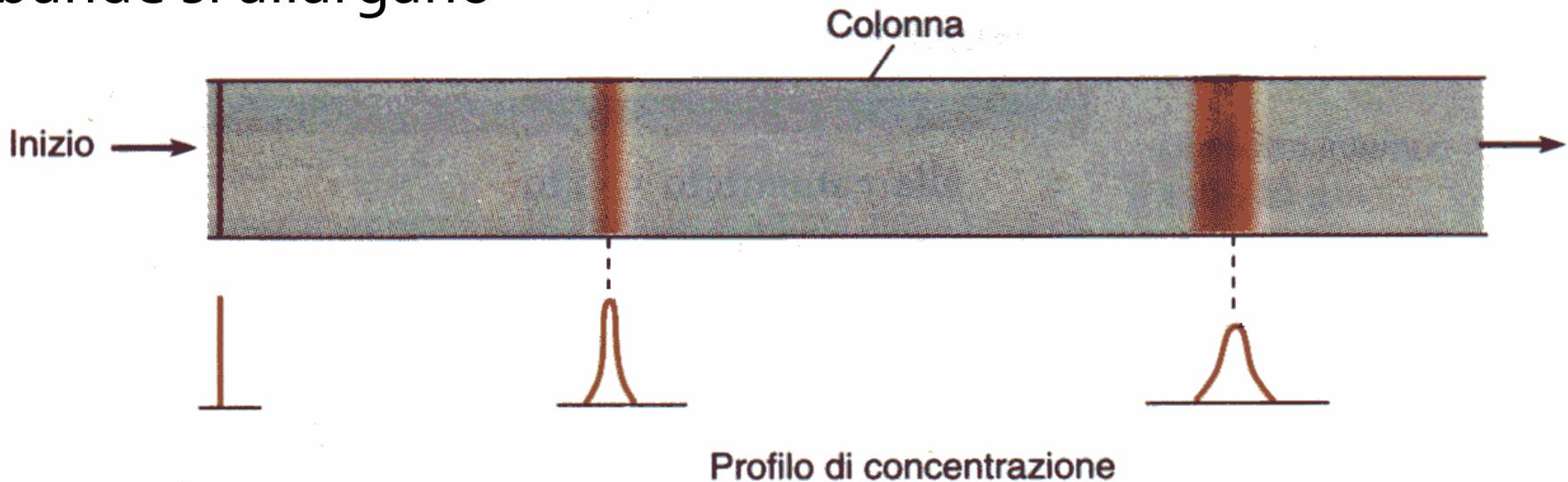
* È importante ricordare che i piatti teorici non esistono realmente. E' un modello teorico sviluppato da Martin e Synge in cui la colonna viene trattata come se fosse costituita da una serie di N strati sottili contigui ma discreti, in ciascuno dei quali viene raggiunto l'equilibrio tra fase stazionaria e fase mobile.

Efficienza

Più N è grande (H piccolo) più l'efficienza è alta.



Durante la "corsa" cromatografica le bande si allargano



Quali sono i fenomeni che provocano allargamento di banda?

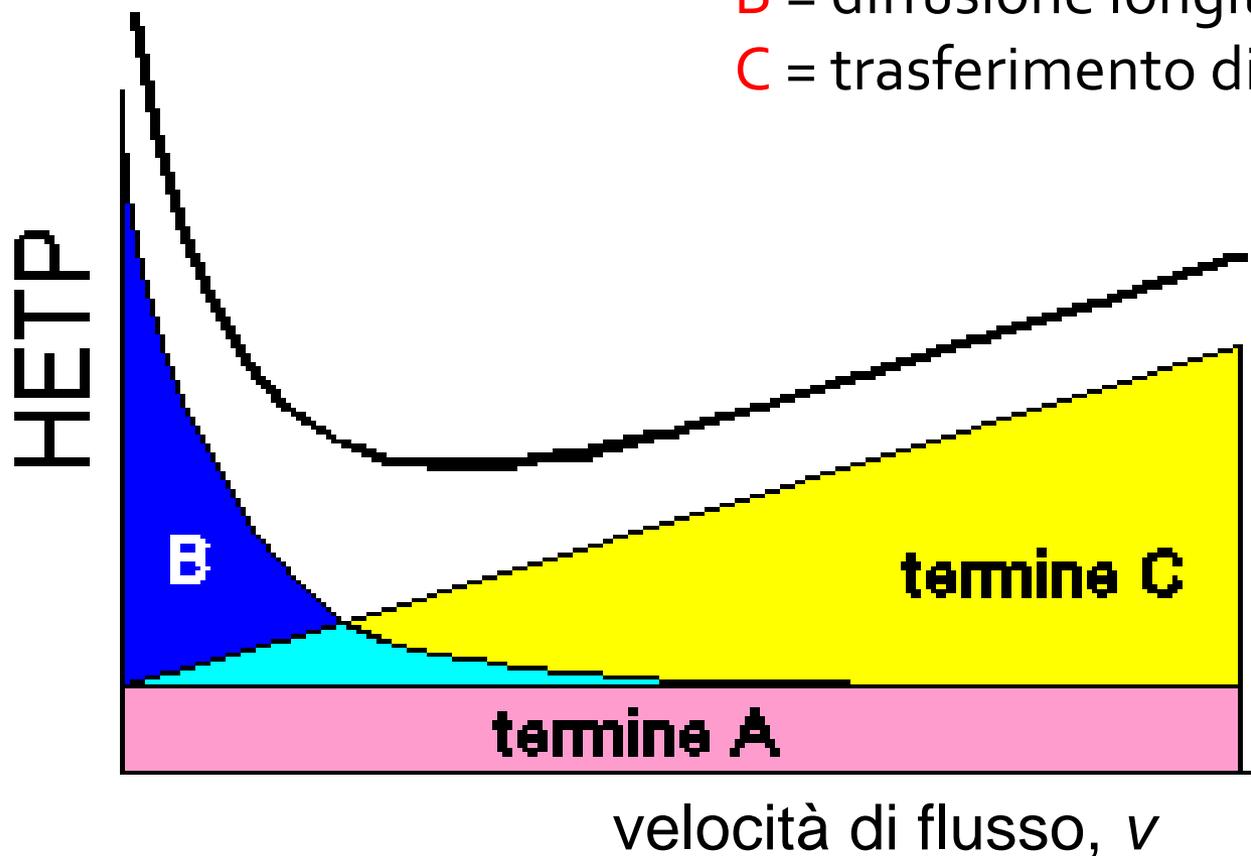
$$H = A + \frac{B}{v} + Cv$$

Equazione di van Deemter

A = eddy diffusion (cammini multipli)

B = diffusione longitudinale

C = trasferimento di massa

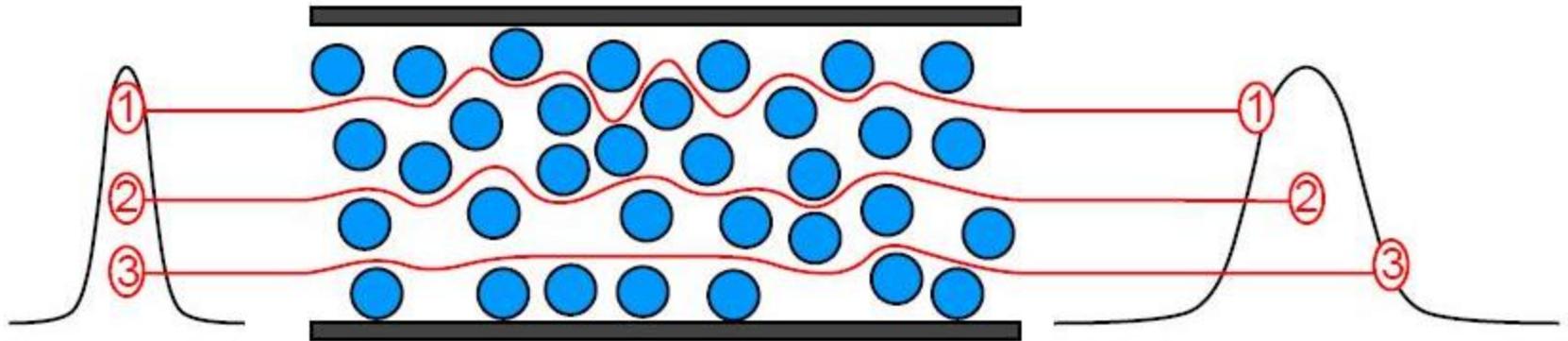


Curva di van Deemter

Eddy diffusion (cammini multipli): termine A

Se la colonna è impaccata, questo fenomeno è dovuto ai diversi percorsi che le molecole possono compiere all'interno della colonna.

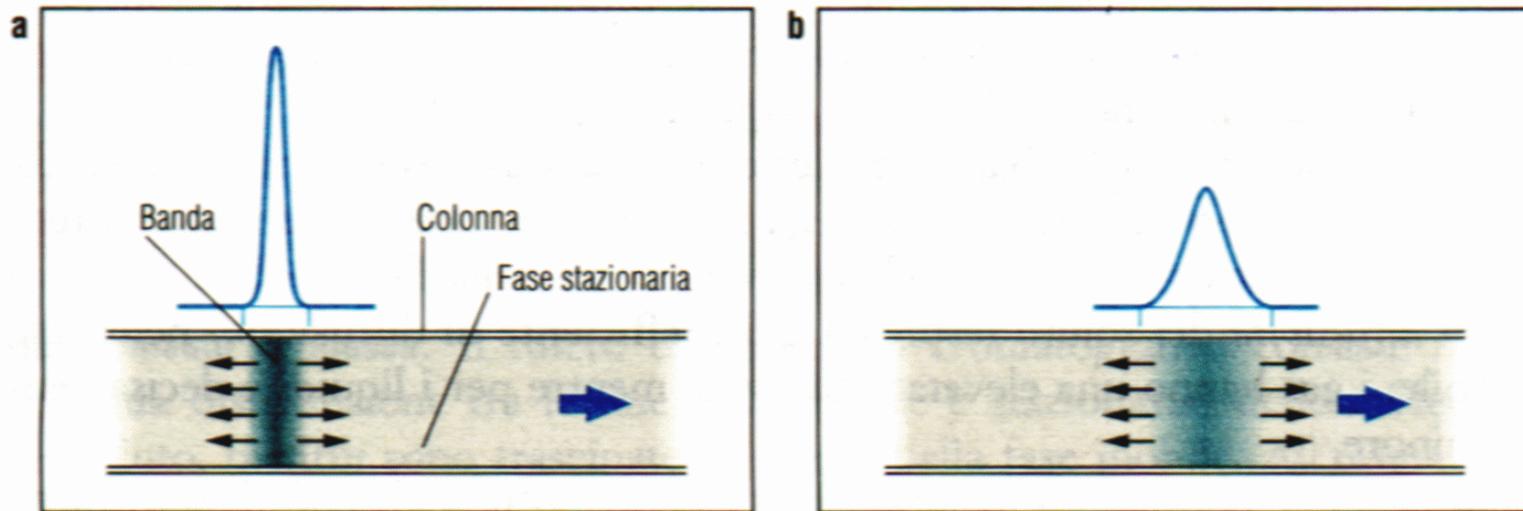
Più l'impaccamento è irregolare e più questo fenomeno è accentuato.



Diffusione longitudinale: termine B

Dovuto al naturale processo di diffusione delle molecole da una zona più concentrata ad una meno concentrata, sia nel senso di scorrimento della fase mobile che in direzione opposta.

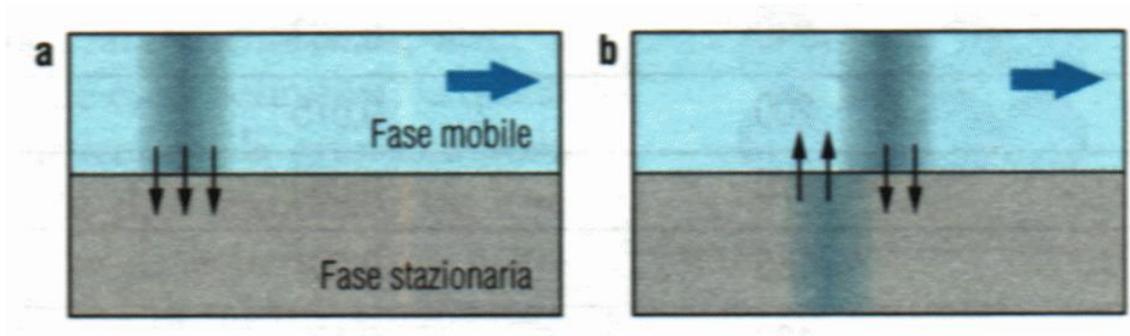
E' inversamente proporzionale alla velocità di flusso.



Trasferimento di massa: termine C

Le molecole più vicine alla fase stazionaria diffondono dalla fase mobile a quella stazionaria. Le molecole rimaste nella fase mobile però si spostano trascinate dal flusso di eluente provocando un allargamento della banda.

E' direttamente proporzionale alla velocità di flusso.



Risoluzione

È la grandezza che misura l'effettiva bontà della separazione, che dipende sia dalla selettività che dall'efficienza del sistema.

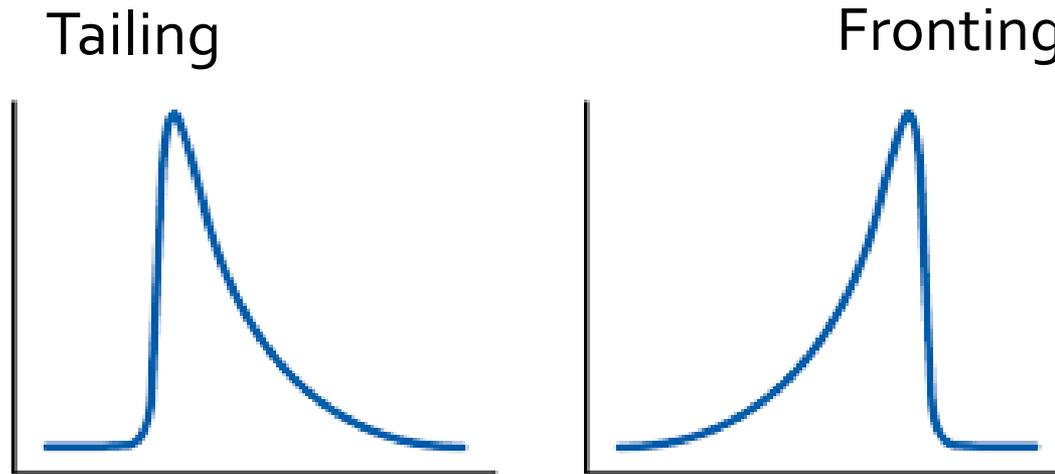
$$R_s = \frac{2(t_{R,B} - t_{R,A})}{(w_A + w_B)}$$

dove w_A , w_B sono le larghezze alla base dei picchi corrispondenti.

R_s è adimensionale e il suo valore è maggiore o uguale a zero.

Asimmetria

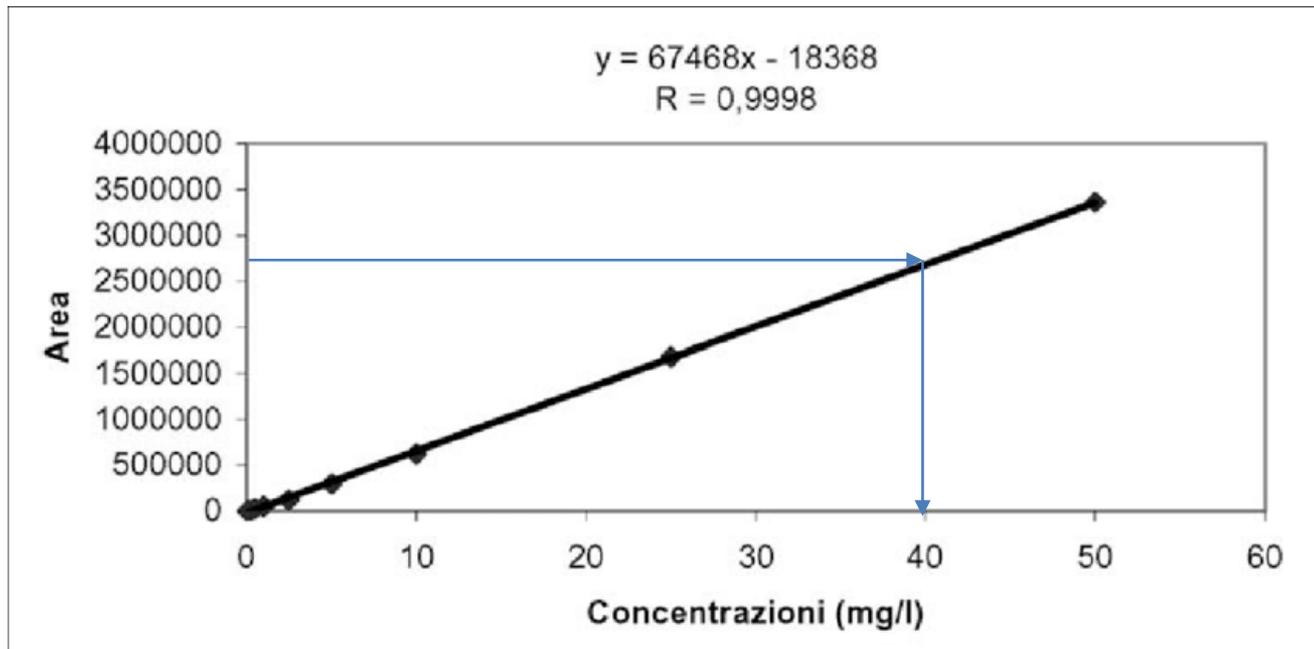
Raramente i picchi cromatografici sono perfettamente simmetrici: normalmente presentano una "codatura" verso i bassi tempi di ritenzione (**fronting**) o verso gli alti tempi di ritenzione (**tailing**).



Area del picco

L'area del picco cromatografico è proporzionale alla quantità di sostanza iniettata e alla sua concentrazione se vengono iniettati volumi costanti.

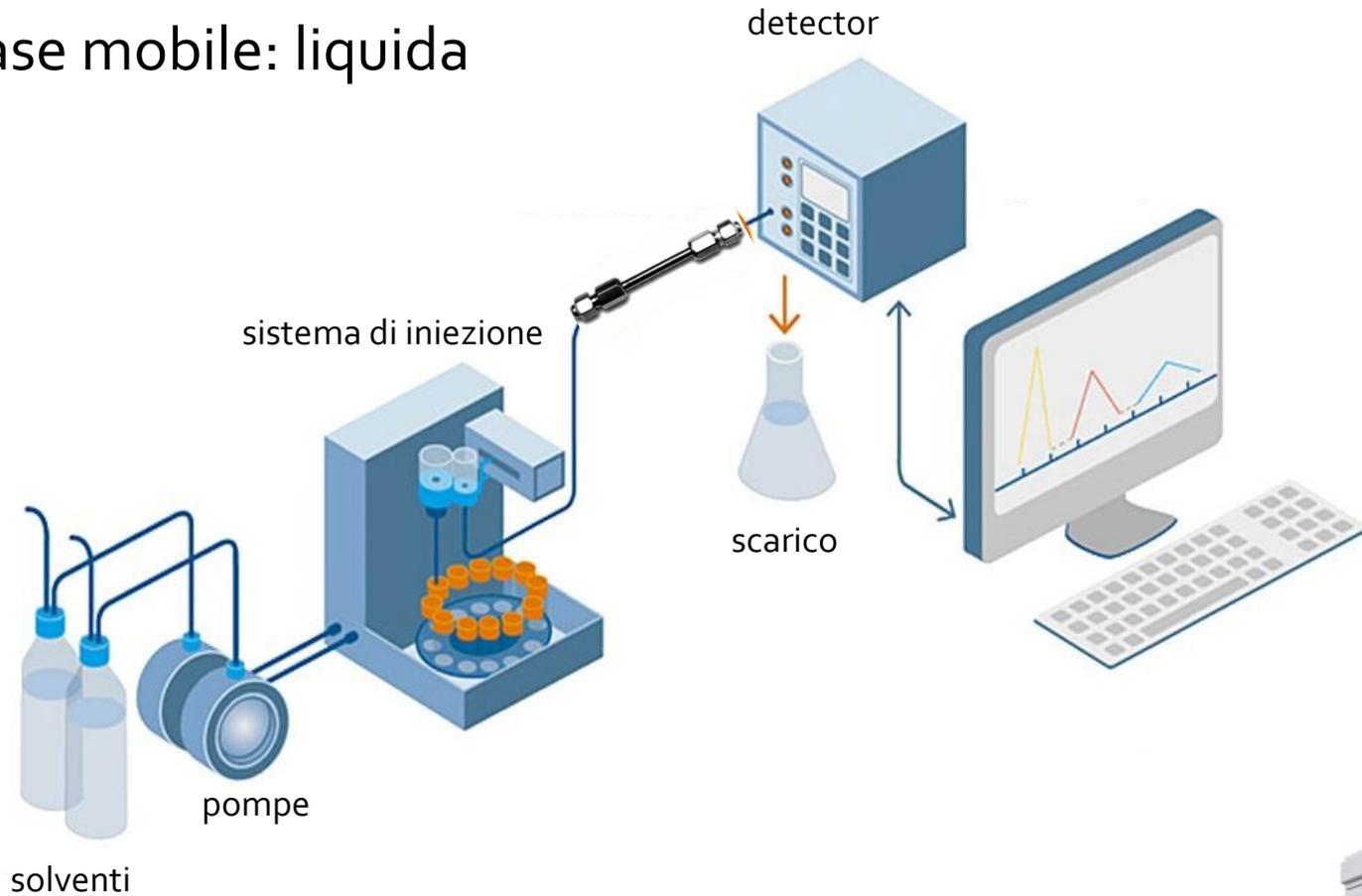
Questo consente di poter determinare la concentrazione di un campione incognito attraverso un'opportuna **curva di calibrazione**.



Cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC)

HPLC: High Performance (o Pressure) Liquid Chromatography

Fase mobile: liquida



Gli strumenti HPLC raggiungono 400 bar.

Esistono anche strumentazioni in grado di raggiungere 1200-1500 bar (Ultra High Performance Liquid Chromatography, UHPLC)



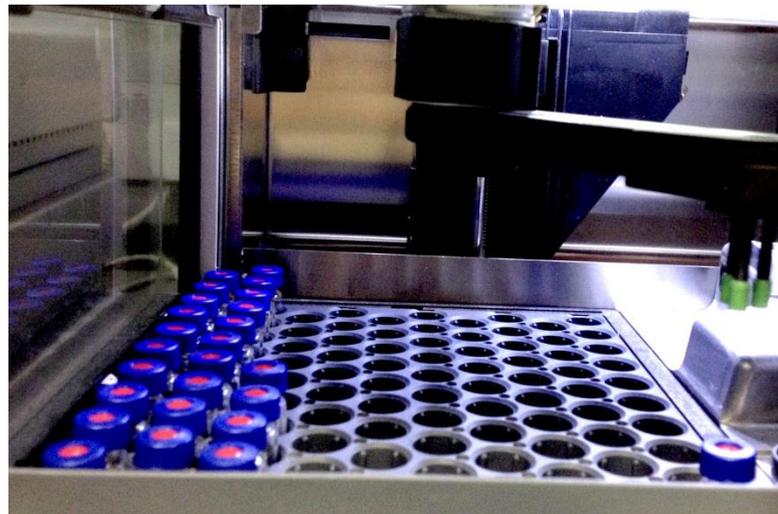
Iniezione

Manuale



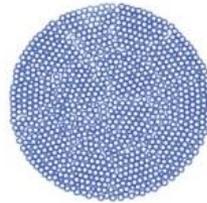
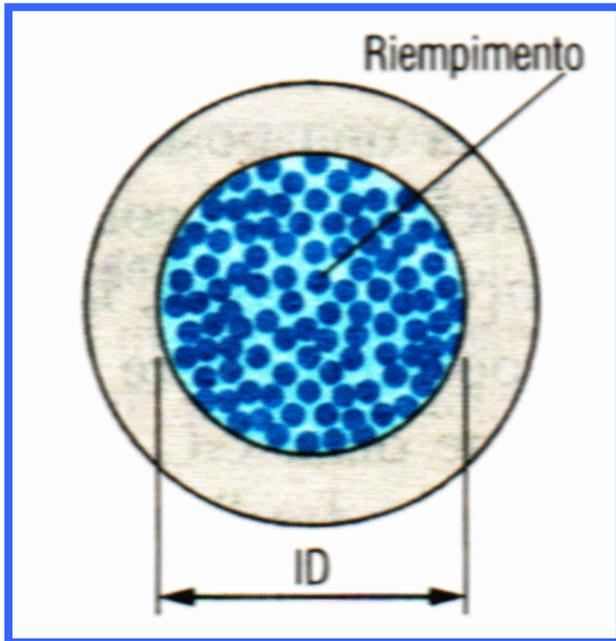
Valvola a 6 vie (Rheodyne)

Autocampionatore

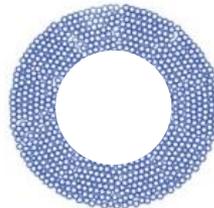


Colonne per HPLC

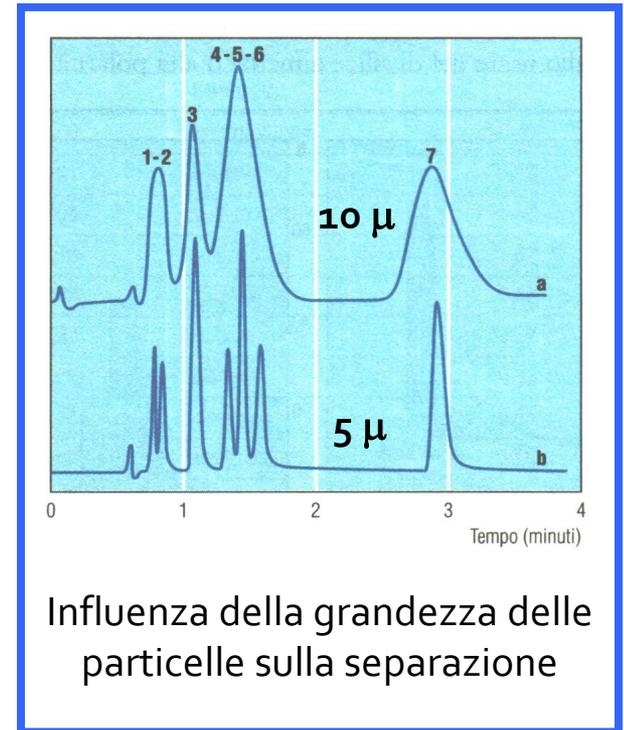
Colonna classica per HPLC (25 cm x 4.6 mm ID)



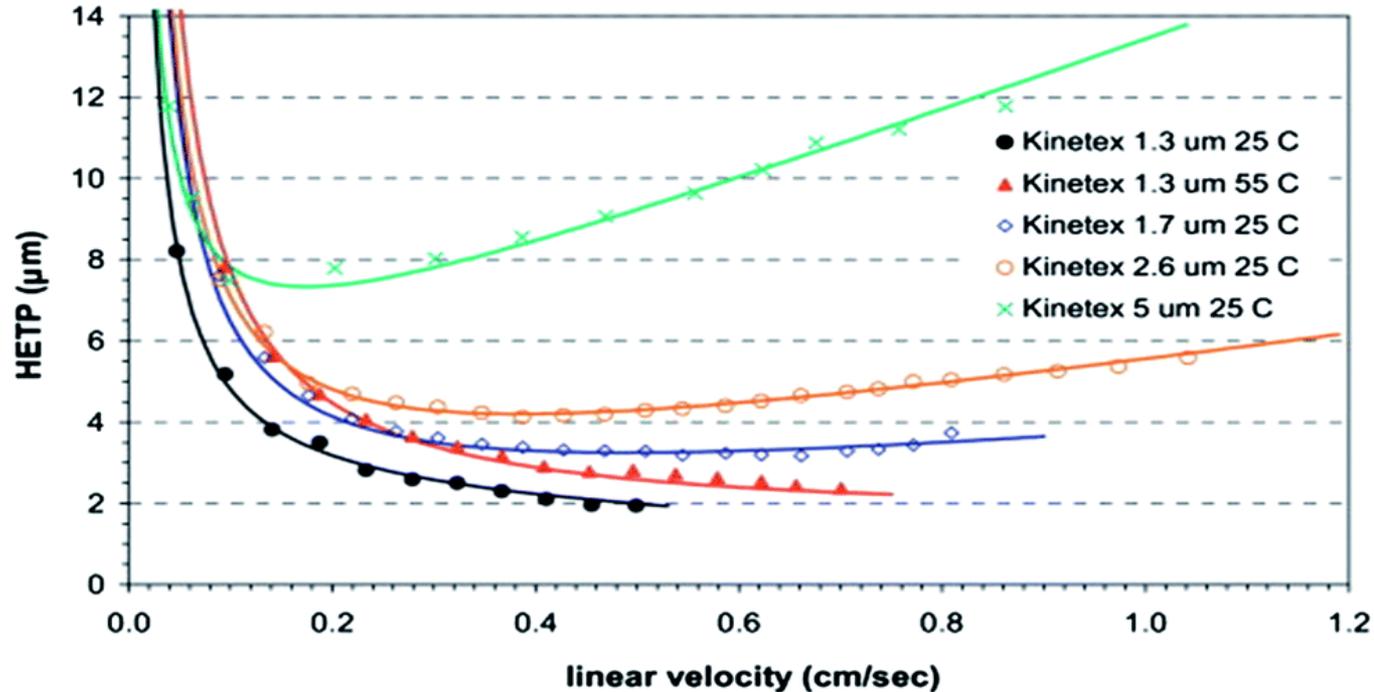
Particelle totalmente porose



Particelle core-shell



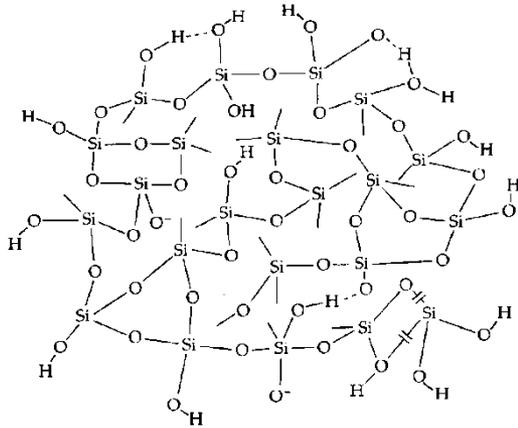
Effetto della grandezza delle particelle sull'efficienza



L'efficienza è **inversamente proporzionale** al diametro delle particelle. Particelle più piccole generano **contropressioni più alte**.

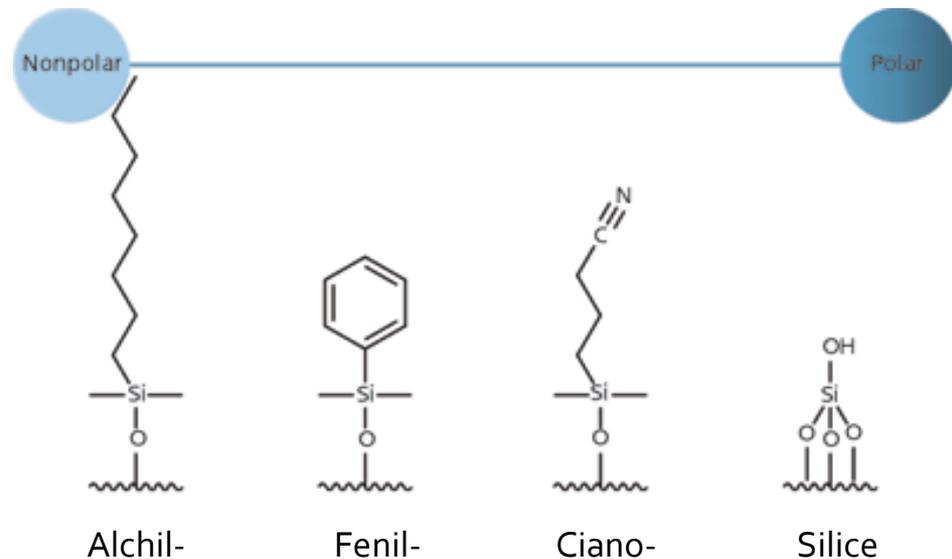
Fasi stazionarie utilizzate in HPLC

Generalmente si utilizza il gel di silice che può essere funzionalizzato con diversi gruppi funzionali.



Struttura del gel di silice

Fasi stazionarie più comuni

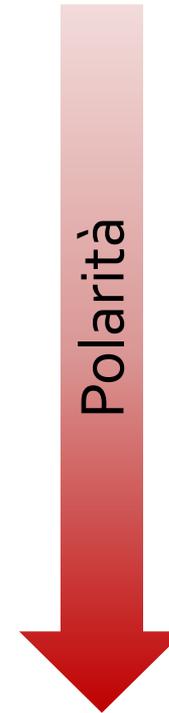


Solventi utilizzati come fase mobile in HPLC

I solventi si classificano in base alla loro **forza eluente** (ϵ_0), la quale misura l'energia di adsorbimento di vari solventi su una determinata fase stazionaria (ad esempio silice).

La lista dei solventi così classificati prende il nome di **serie eluotropica**.

Solvente	ϵ_0
Pentano	0.00
Esano	0.01
Diclorometano	0.42
Acetato di etile	0.48
Metil tert-butil etere	0.48
Acetonitrile	0.52
Acetone	0.53
Tetraidrofurano	0.53
2-propanolo	0.60
Metanolo	0.70
Acqua	elevata

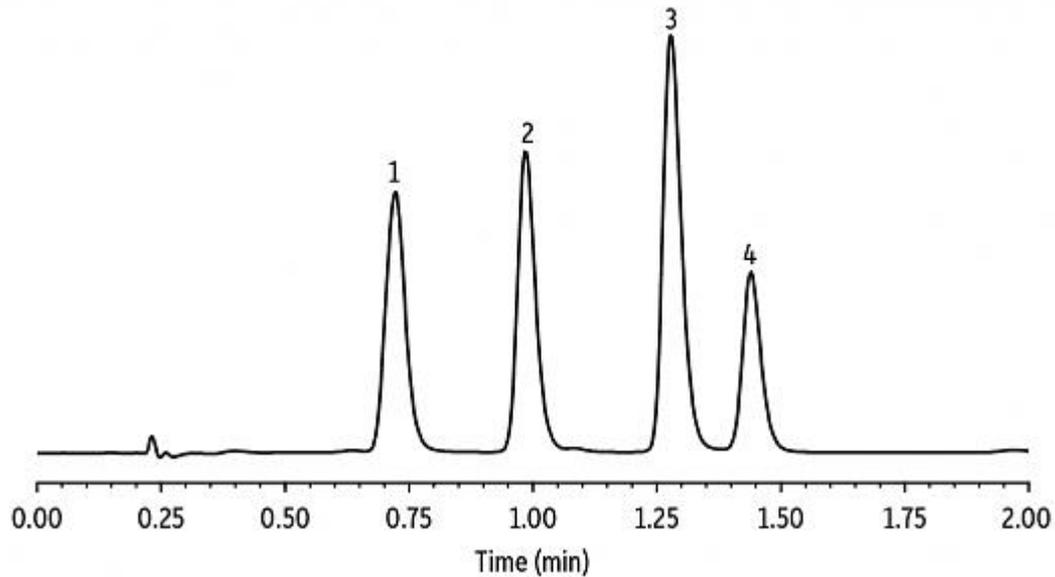


HPLC: fase normale

Fase stazionaria **polare**: ad es. silice

Fase mobile **apolare**: ad es. esano

I campioni polari vengono trattenuti di più in colonna rispetto a quelli apolari



Apolari

Mediam. polari

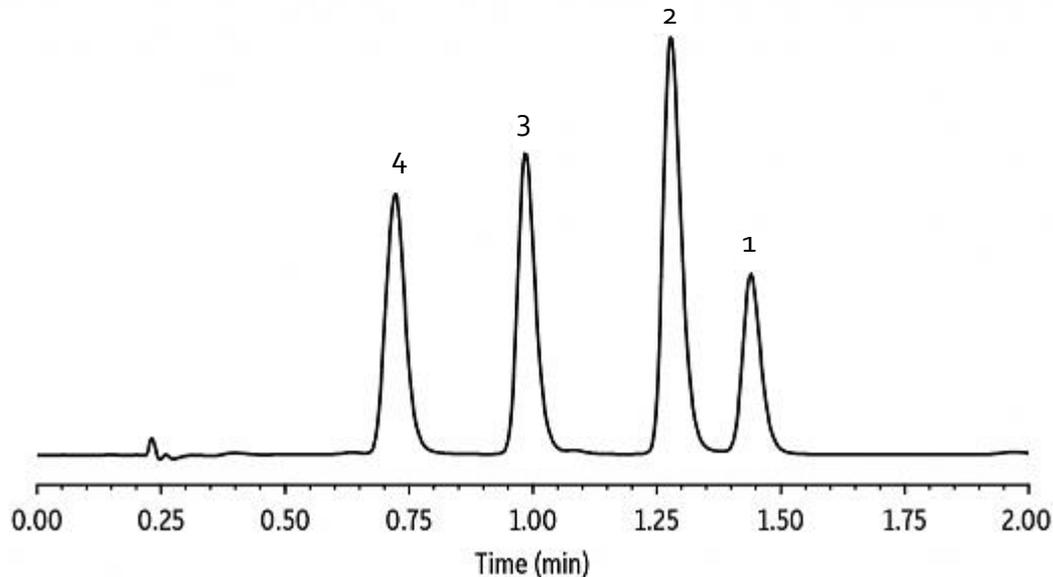
Polari

HPLC: fase inversa

Fase stazionaria **apolare**: ad es. catene di idrocarburi (C₁₈, C₈, C₄)

Fase mobile **polare**: ad es. miscele di acqua e modificatori organici (H₂O/acetonitrile, H₂O/alcol)

I campioni apolari vengono trattenuti di più in colonna rispetto a quelli polari



Polari

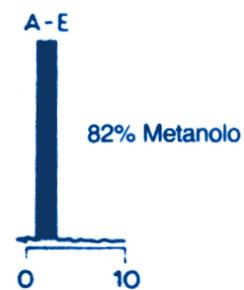
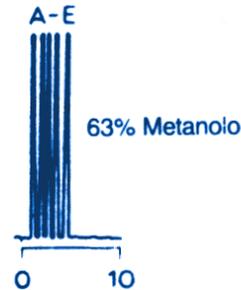
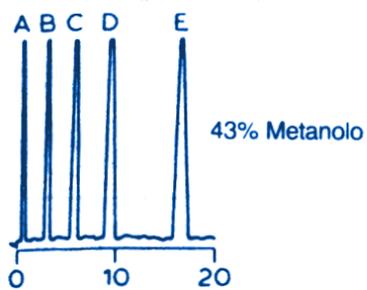
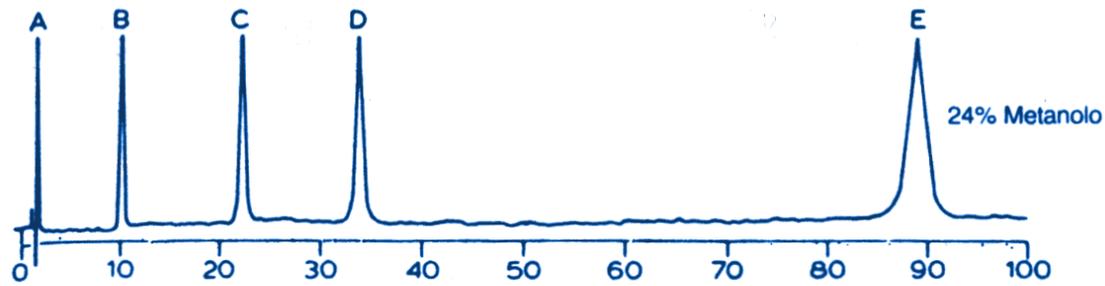
Mediam. polari

Apolari

Ritenzione in HPLC a fase inversa

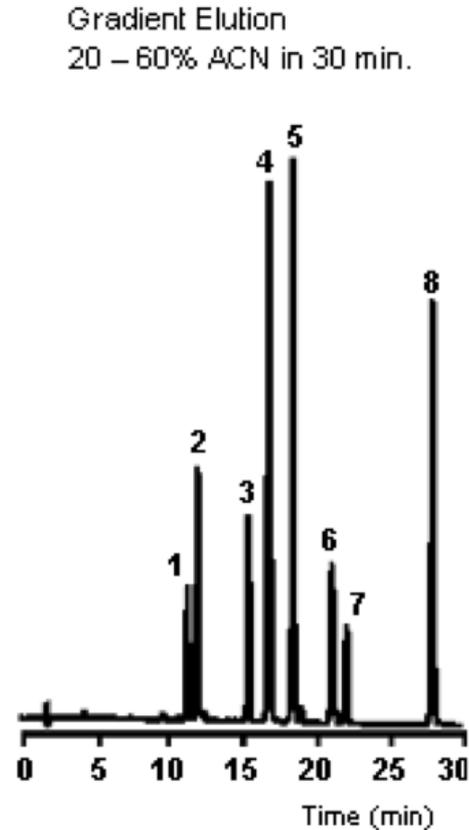
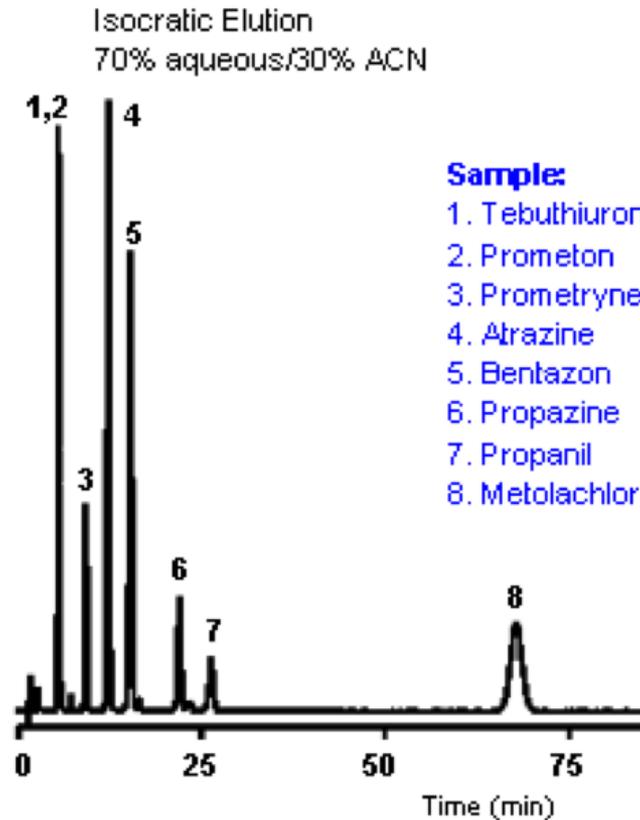
La ritenzione dipende dalla % di solvente organico:

$$\log k' = a \cdot (\%_{\text{org}}) + b$$



Separazione di una ipotetica miscela di cinque componenti, in diverse condizioni di eluizione isocratica con miscele acqua/metanolo.

Effetto della composizione della fase mobile



Condizioni isocratiche:
La % di fase mobile è
costante

Eluizione in gradiente:
La % di fase mobile viene
fatta variare nel tempo

Rivelatori

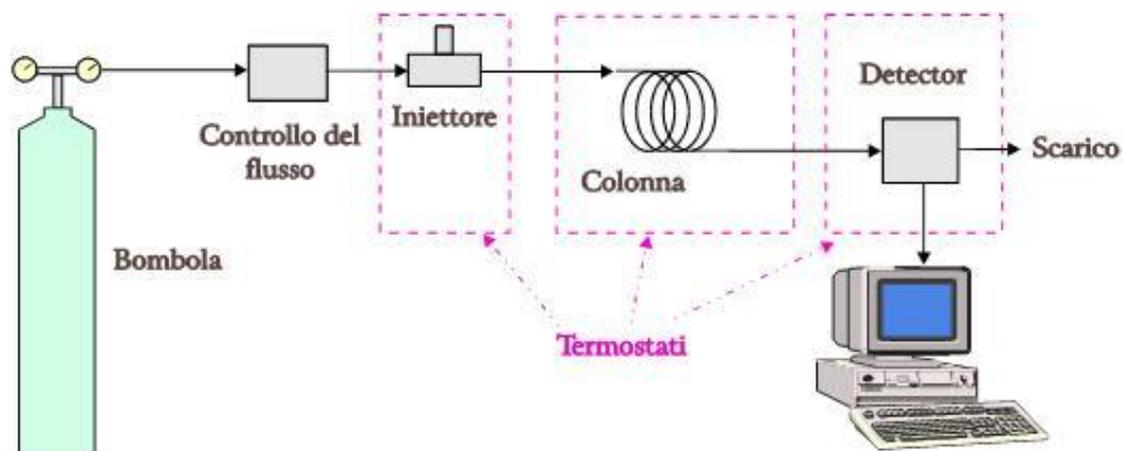
- UV a lunghezza d'onda fissa
- UV a lunghezza d'onda variabile
- UV a serie di diodi (il più utilizzato)
- A fluorescenza
- Indice di rifrazione
- Spettrometro di massa

Gaschromatografia (GC)

GC: Gascromatografia

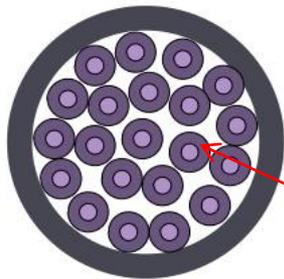
Fase mobile: gassosa

Gas utilizzati: elio, argon, idrogeno, metano, CO₂



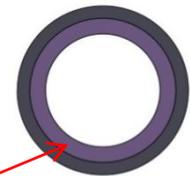
Colonne per GC

Colonna impaccata per GC:
1-6 m x 0.75-4 mm ID



Fase stazionaria:
supporto solido + liquido non volatile

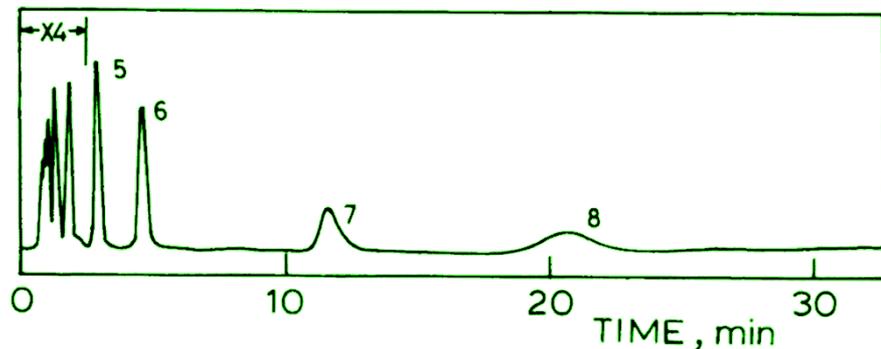
Colonna capillare per GC:
15-100 m x 0.1-0.75 mm ID



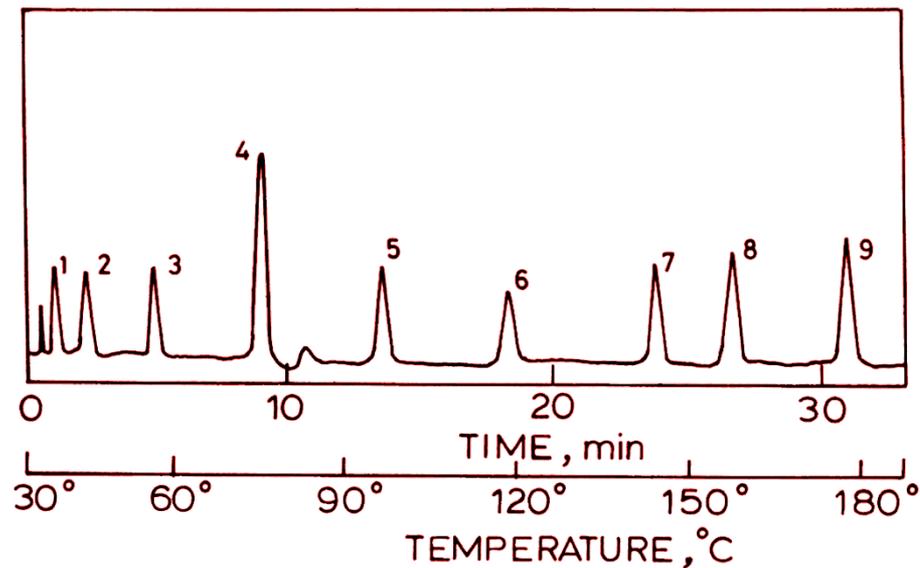
Film di fase stazionaria:
metil-silossani funzionalizzati

Effetto della temperatura in GC

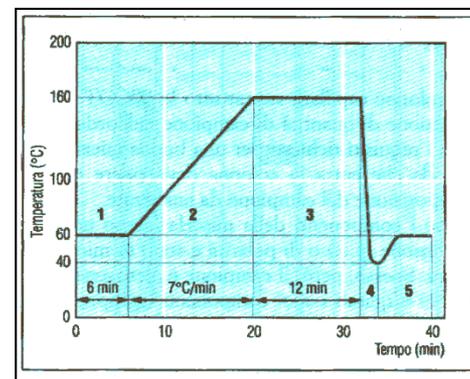
La temperatura della colonna è uno dei parametri principali che governano la ritenzione in GC.



Condizioni isoterme (T costante)



Gradiente di temperatura

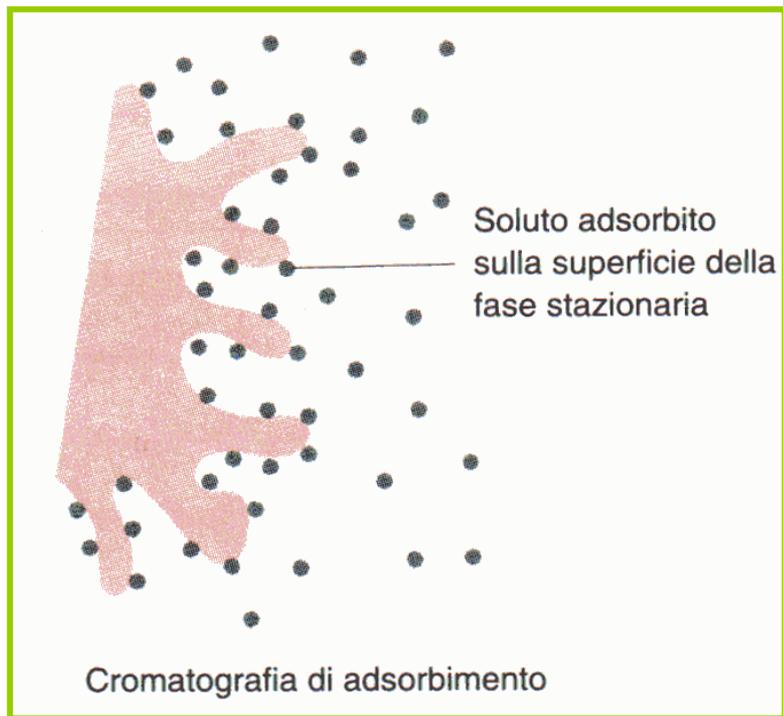


Rivelatori

- A conducibilità termica (TCD)
- A ionizzazione di fiamma (FID)
- A cattura di elettroni (ECD)
- Spettrometro di massa

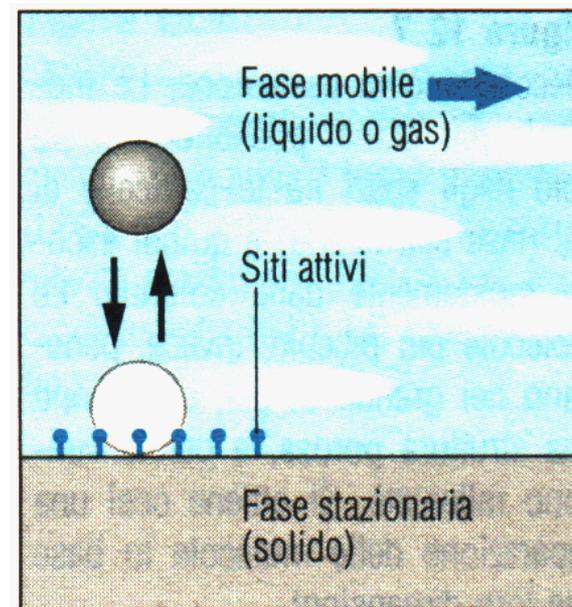
Meccanismi di ritenzione

Adsorbimento



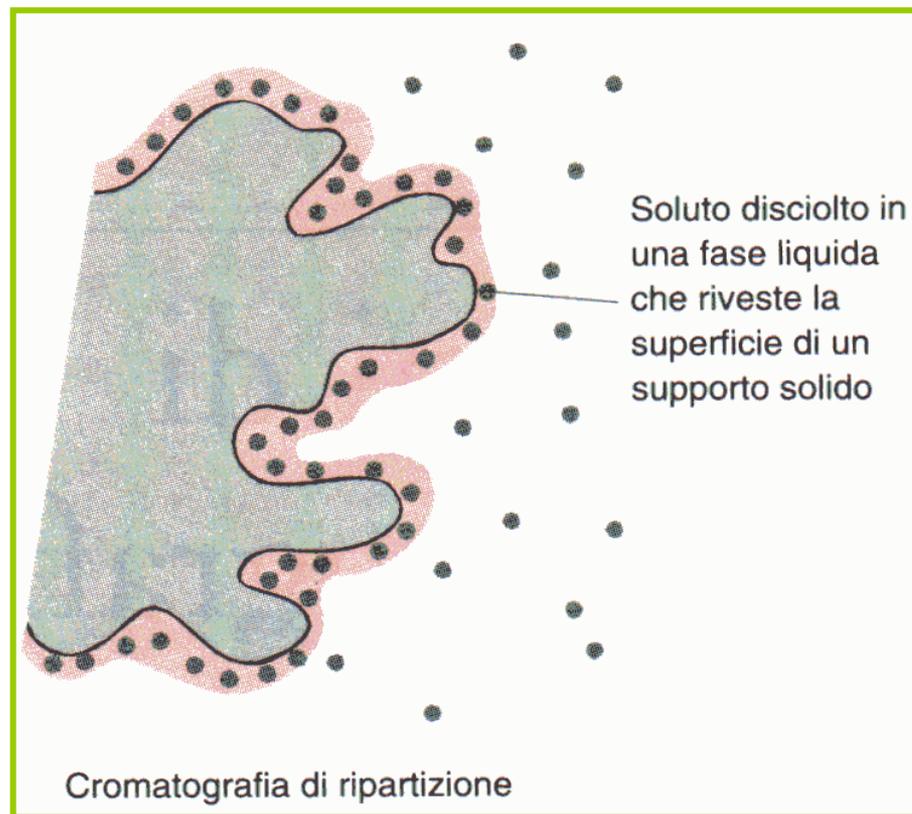
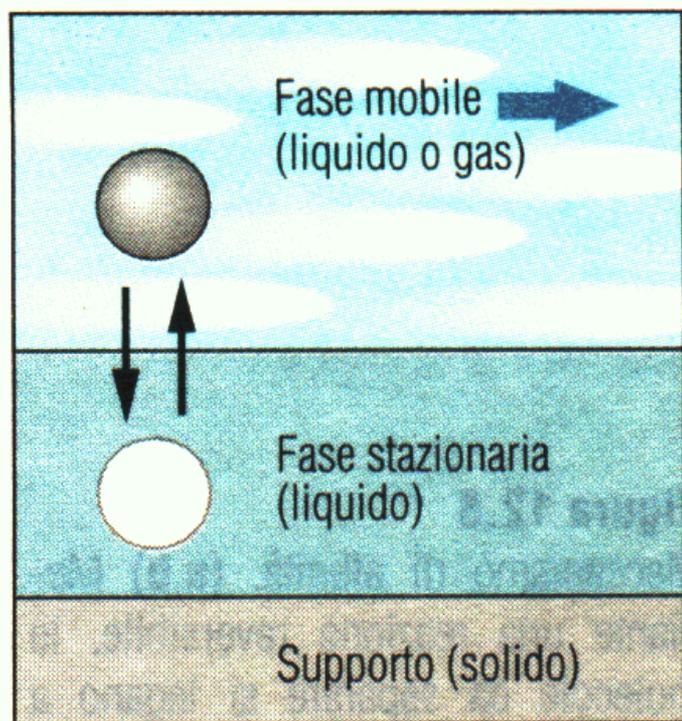
La separazione avviene mediante l'alternarsi di fenomeni di **adsorbimento e desadsorbimento**.

La fase stazionaria è un solido sulla cui superficie si trovano **siti attivi** in grado di stabilire legami secondari (dipolo-dipolo, legami a idrogeno, etc.) con le molecole di analita.



Ripartizione

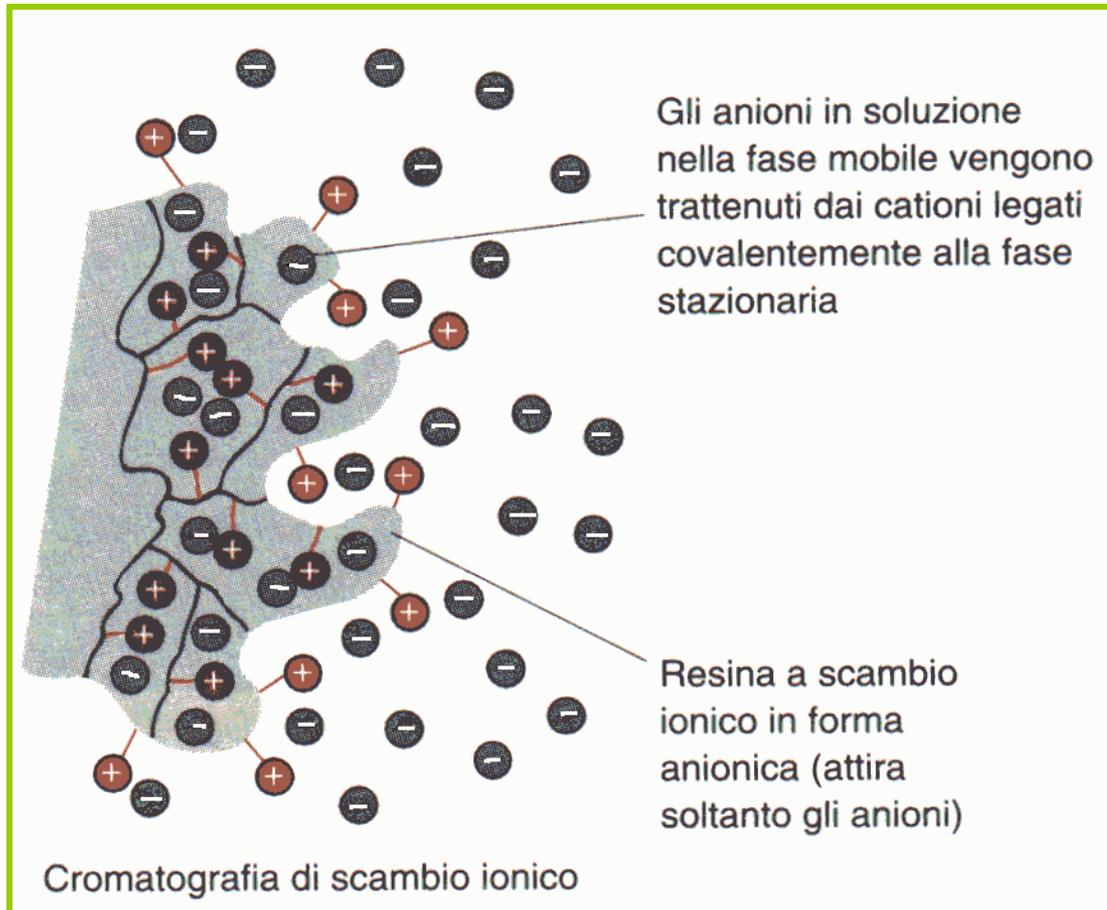
La fase stazionaria è un liquido che ricopre un supporto solido.



La separazione avviene grazie alla ripartizione degli analiti fra fase mobile e stazionaria in base alla solubilità che essi hanno nelle due fasi.

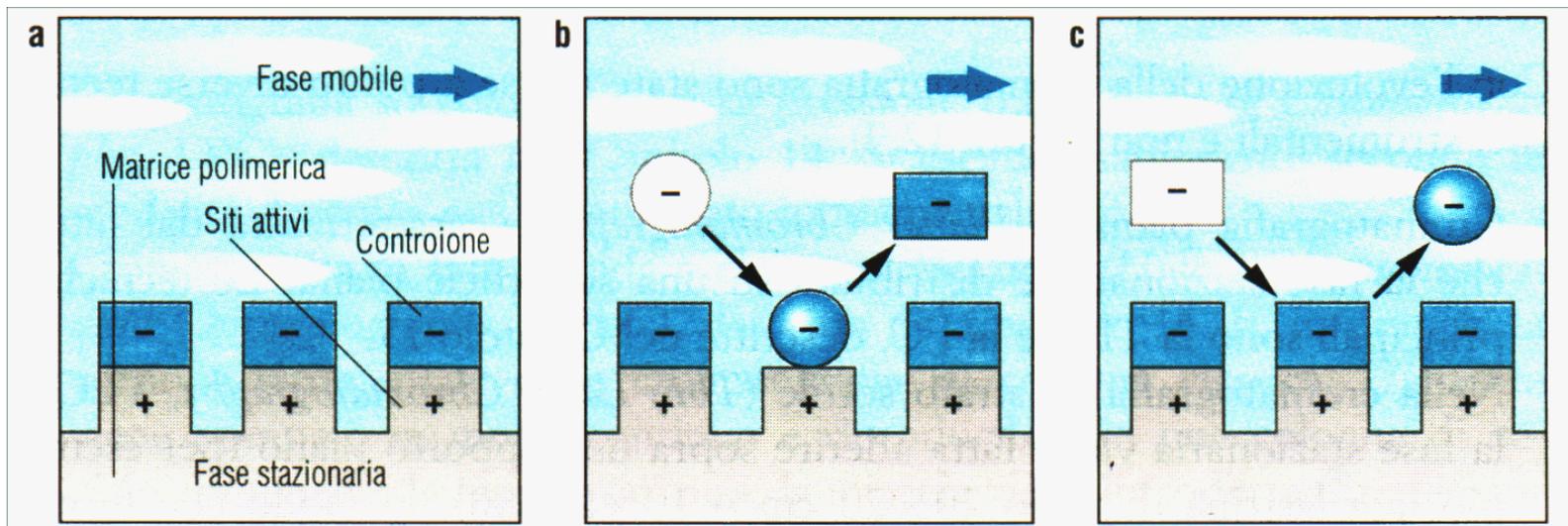
Scambio ionico

La fase stazionaria è un solido che presenta in superficie gruppi che portano una carica elettrostatica, positiva o negativa.



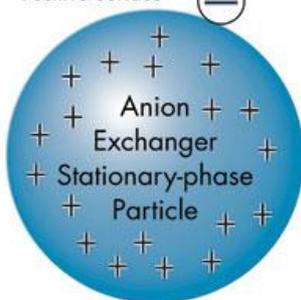
Scambio ionico

Gli ioni del soluto competono con quelli della fase mobile per legarsi ai gruppi di carica opposta presenti sulla fase stazionaria.



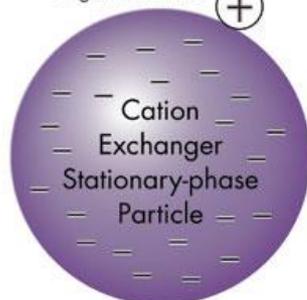
Negatively Charged Analyte [Anion]

Attracted to Positive Surface



Positively Charged Analyte [Cation]

Attracted to Negative Surface

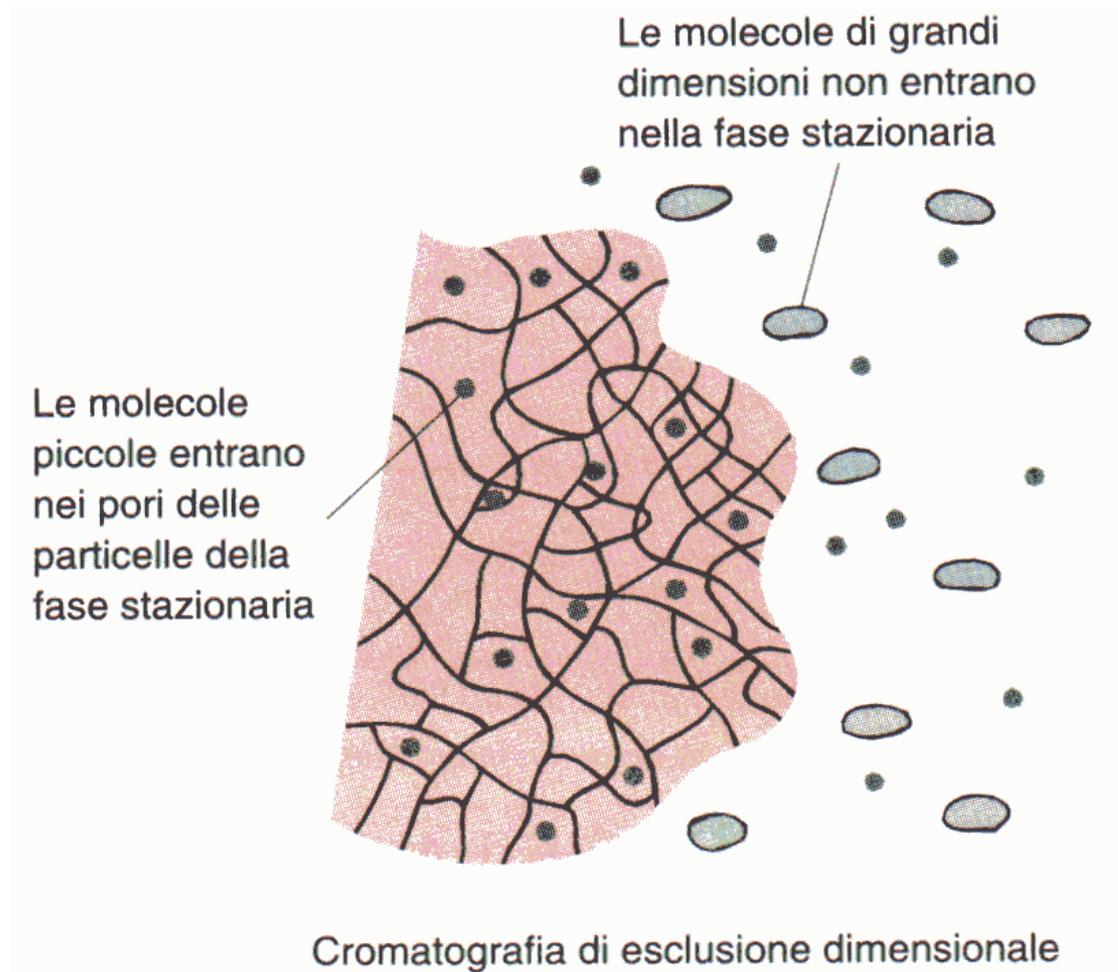


Utilizzata in analisi cliniche diagnostiche per la quantificazione di:

- amminoacidi
- acidi nucleici

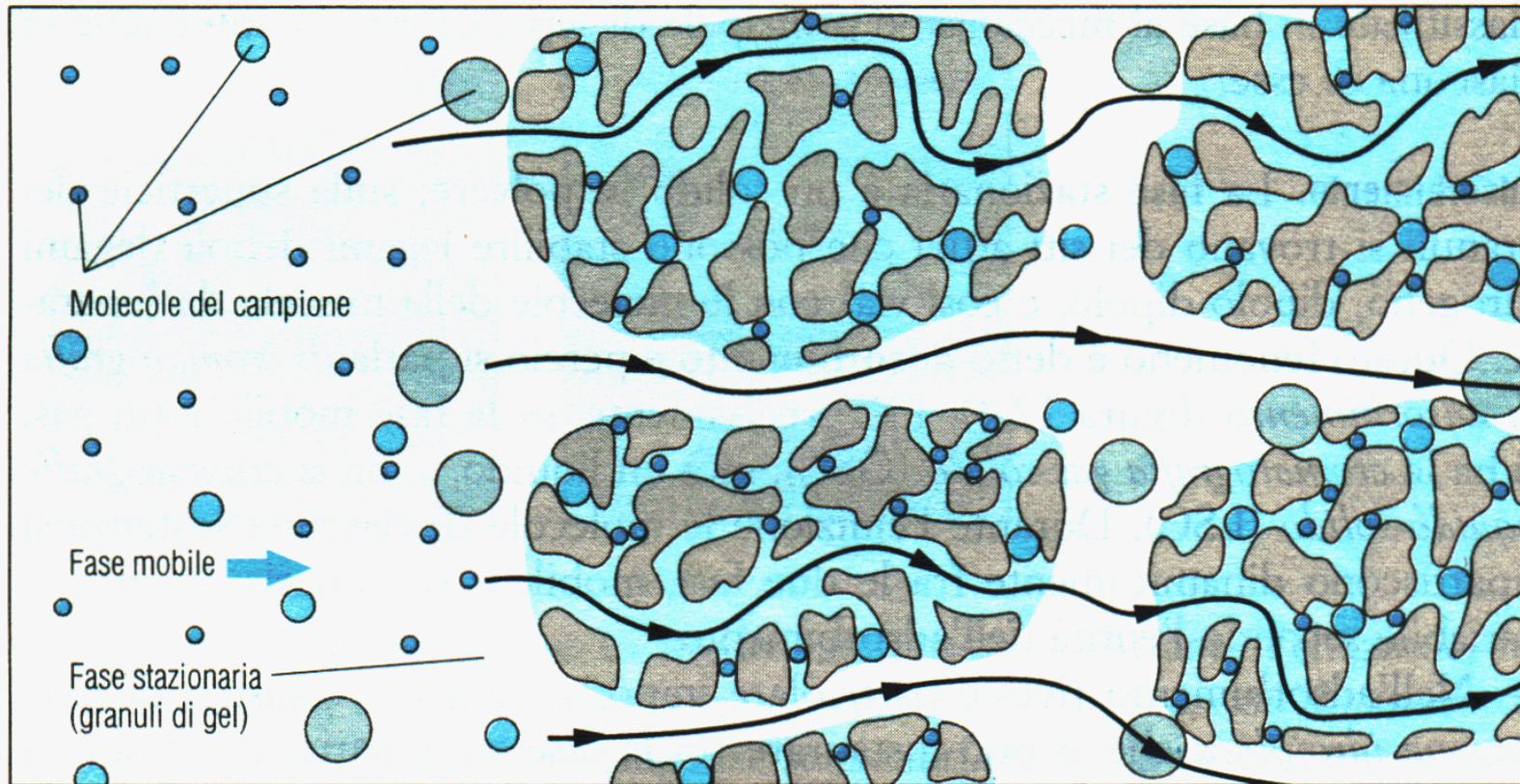
Esclusione sterica

La fase stazionaria è un solido o un gel che presenta dei pori di dimensioni note ed opportune.



Esclusione sterica

Le molecole più grosse non possono entrare nei pori e vengono "eluite" prima di quelle più piccole.



Utilizzata per la separazione di:

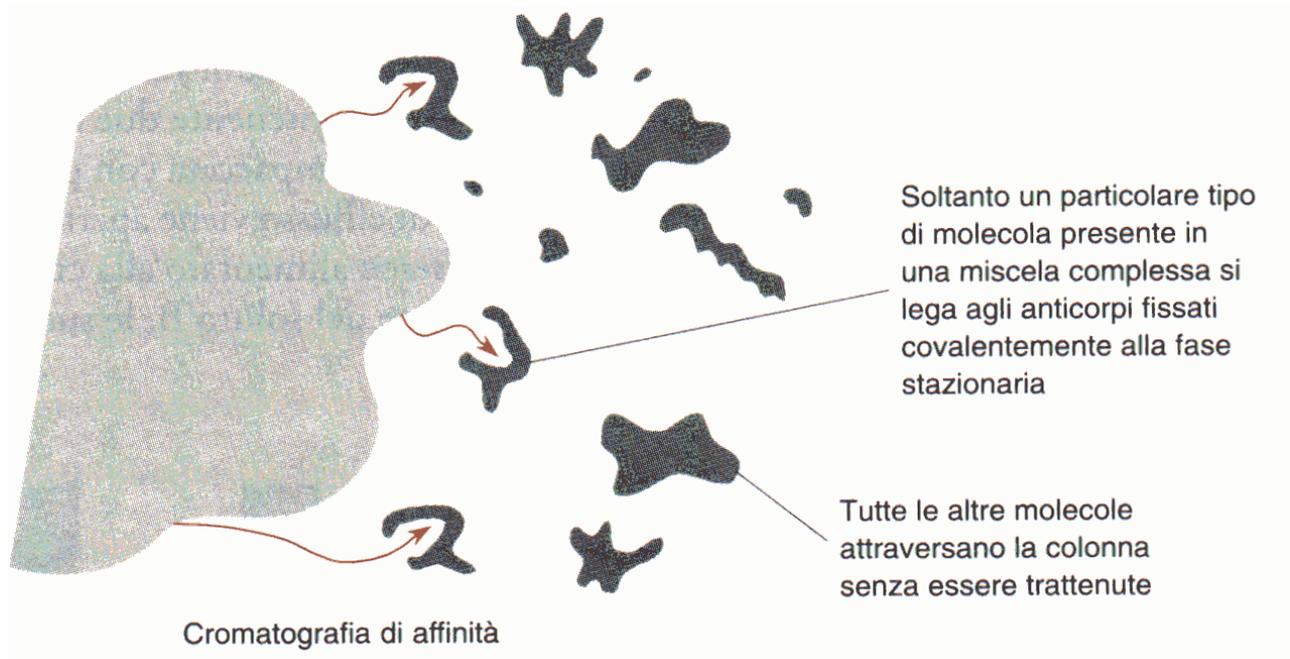
- Nanoparticelle (drug delivery system)
- Aggregati (anticorpi)
- Polimeri

Affinità

La fase stazionaria è un solido derivatizzato in superficie con "recettori" in grado di legare solo la molecola in esame.

Interazioni specifiche:

- antigene/anticorpo
- enzima/substrato
- proteina/ligando

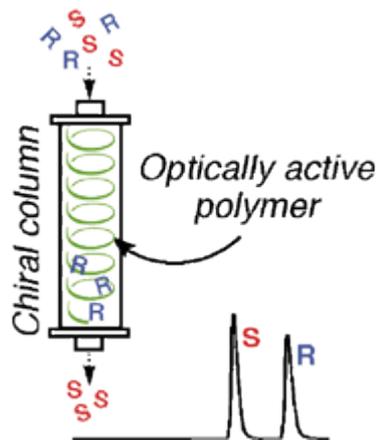
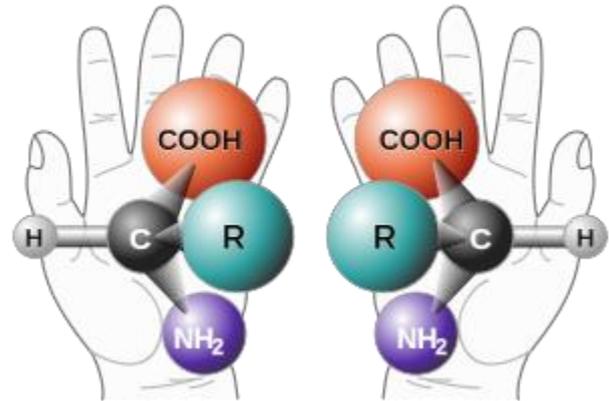


Su fase chirale

Consente di riconoscere e separare molecole chirali (**enantiomeri**) se presenti all'interno della stessa miscela.

Gli enantiomeri hanno le stesse proprietà chimico-fisiche.

Gran parte dei farmaci e delle molecole biologicamente attive sono chirali.



In cromatografia chirale, la fase stazionaria è funzionalizzata con una molecola chirale (**selettore**) che forma due **diastereoisomeri transitori** aventi differente stabilità con gli enantiomeri presenti nel campione.

Su fase chirale

Principali selettori chirali utilizzati:

- Ciclodestrine
- Antibiotici macrociclici (teicoplanina, vancomicina)
- Polisaccaridi (cellulosa, amilosio)
- Scambiatori ionici chirali (chinina, chinidina)

Cromatografia analitica vs. preparativa

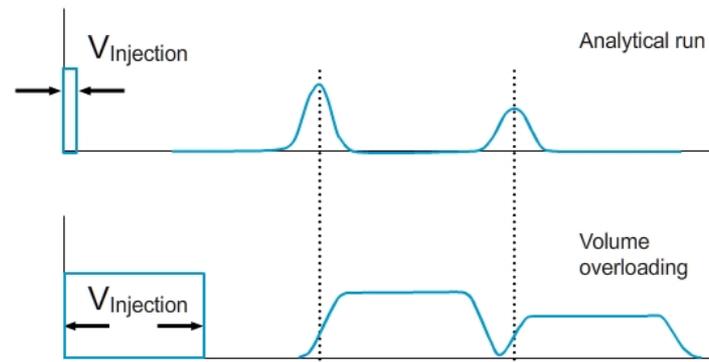
Cromatografia analitica

- Determinazione quali- e quantitativa dei componenti di una miscela
- Piccole quantità di campione iniettato (ordine dei μL)
- Non si raccoglie ciò che viene eluito dalla colonna
- Flussi max 5-8 mL/min
- Colonne con particelle max 5 μm



Cromatografia preparativa

- Purificazione di un composto target
- Elevate quantità di campione iniettato (overloading)
- Si raccoglie ciò che viene eluito dalla colonna
- Flussi anche fino a 50 mL/min
- Colonne con particelle 10-30 μm



Considerazioni conclusive

**La cromatografia è una classe di tecniche molto versatili.
Infatti:**

- è applicabile a tutti i tipi di campione (eventualmente con un opportuno pretrattamento);
- indispensabile sia per l'analisi qualitativa che quantitativa;
- largamente utilizzata per il controllo qualità;
- impiegata a scopo preparativo (purificazione) nell'industria farmaceutica (e non solo).