

# 1. SEPARAZIONE DI MISCELE

Le tecniche di separazione non sono dei veri e propri metodi analitici, ma sono di notevole importanza in chimica analitica ed di sintesi chimica, in quanto **spesso l'applicazione di una qualunque tecnica strumentale (e non) di determinazione deve essere preceduta da un metodo di separazione parziale o totale dell'analita, in modo da ottenere un composto puro!!**

La scelta della tecnica separativa dipenderà dal **tipo** di miscela e dal **componente** da separare.

Le miscele (o miscugli) possono essere costituite da componenti liquidi, solidi o gassosi e si possono dividere in due tipi:

- 1. Miscele omogenee;***
- 2. Miscele eterogenee.***

Al primo tipo corrispondono quei sistemi nei quali i **componenti non sono più distinguibili** e si presentano in un'unica fase: si definisce –soluzione–. Possono essere soluzioni solide (es. le leghe), liquide (acqua-aceto; acqua+NaCl; ecc..), gassose (aria atmosferica; acqua+CO<sub>2</sub>).



Al secondo tipo appartengono quelle miscele i cui componenti differiscono per proprietà chimico/fisiche e/o stato della materia **e i componenti risultano ancora distinguibili** (es. schiume, emulsioni, sospensioni, ecc.). Es. acqua+olio:



1. Per le **miscele omogenee** le tecniche di separazione più comuni sono:

- A. Estrazione con solvente**
- B. Cristallizzazione**
- C. Distillazione**
- D. Sublimazione**
- E. Cromatografia**

2. Per le **miscele eterogenee** le tecniche di separazione più comuni sono:

- F. Evaporazione**
- G. Filtrazione**
- H. Centrifugazione**

## A. ESTRAZIONE CON SOLVENTE

La distribuzione di un soluto fra due liquidi completamente o parzialmente immiscibili, costituisce la base dei procedimenti di estrazione con solvente.

Il processo di estrazione è regolato dalla:

### ***“legge di distribuzione o di partizione”***

*Quando ad un sistema costituito da due fasi (strati) immiscibili o debolmente miscibili fra di loro e si aggiunge una terza sostanza solubile in entrambe, questa si distribuisce in modo tale che il rapporto della sua concentrazione nei due strati risulti costante a temperatura costante.*

$$K = \text{costante} = \frac{C_a}{C_b}$$

$C_a$  = conc. della sostanza nel solvente a.

$C_b$  = conc. della sostanza nel solvente b.

La costante **k** viene definita come “coefficiente di distribuzione o di partizione” ed è approssimativamente uguale al rapporto della solubilità della sostanza nei due solventi.

Di massima importanza risulta la scelta dei solventi di estrazione da impiegare per estrarre certe sostanze.

-Composti poco solubili in acqua possono essere estratti con etere etilico o di petrolio, viceversa se trattasi di sostanze alquanto idrosolubili si preferirà l'acetato di etile.

### Serie eluotropica

E' in relazione al potere eluente dei solventi nei confronti di una data fase stazionaria. E' la misura del calore svolto dall'interazione del solvente con una data fase stazionaria (fissa) e riflette a grandi linee la scala di polarità.

#### ***Serie eluotropica rispetto $\text{SiO}_2$ o $\text{Al}_2\text{O}_3$***

Esano - competitivo

Benzene

Etere etilico

Cloroformio

Diclorometano

*Acetone*

Acetato di etile

*Alcool etilico*

Acqua + competitivo

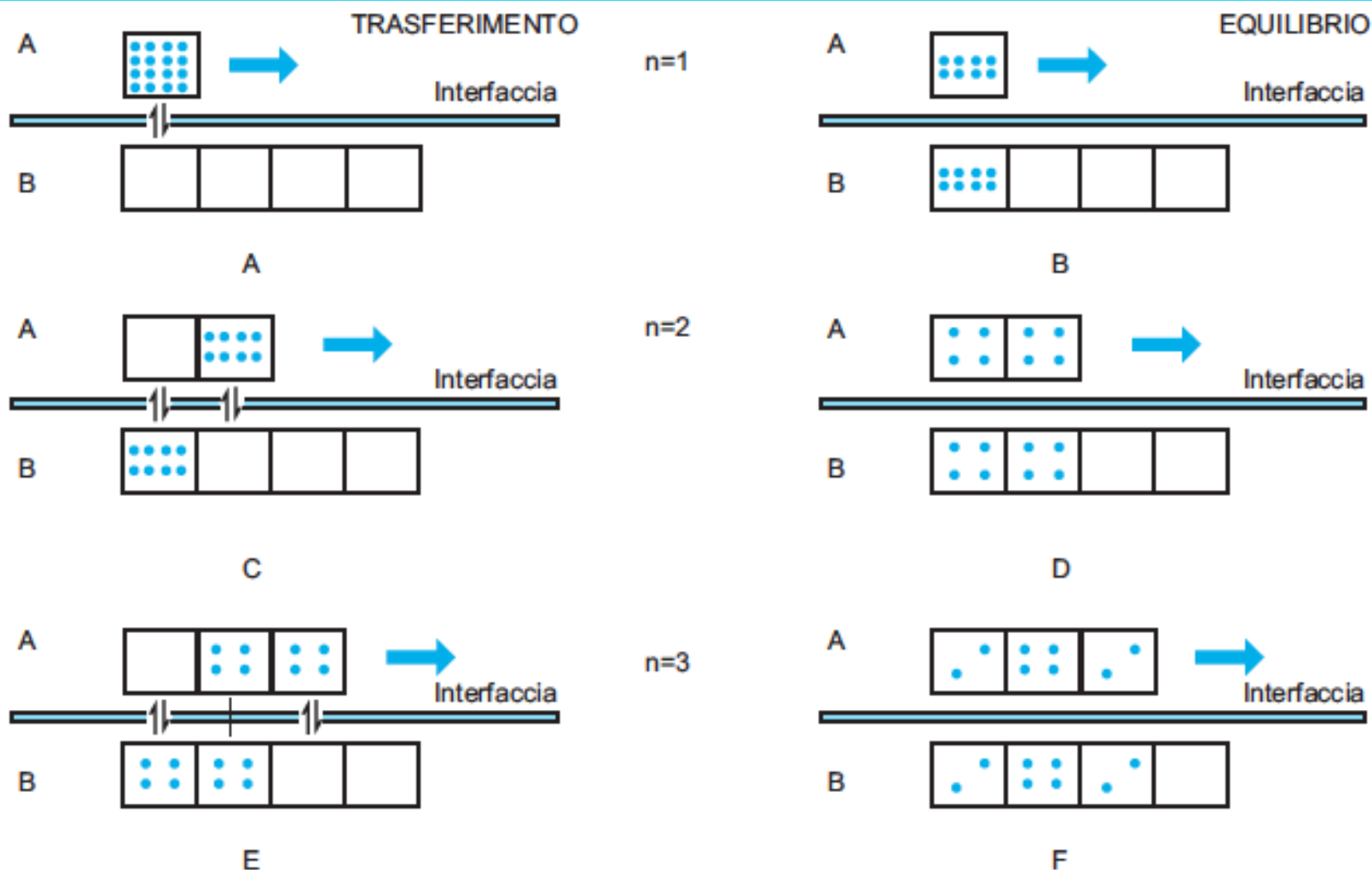
**N.B.** Se la fase stazionaria è non polare, l'ordine di competitività si inverte!

Il coefficiente  $K$  può essere influenzato dal pH o dalla presenza di elettroliti.

Ad es. l'aggiunta di NaCl alla soluzione acquosa (si usa direttamente una soluzione acquosa di NaCl fortemente satura già preparata) ne abbassa la solubilità dei composti organici in essa presenti che a volte formano sistemi colloidali tra le due fasi e, quindi, tali composti risulteranno meglio ripartiti nella fase organica che sarà più facilmente separabile (salted out).

### *Esempio (Fig.):*

Supponiamo un sistema di imbuti separatori in serie immaginandoli come comparti che “scivolano” uno sull'altro alternando fasi di trasferimento di materia ed equilibrio. Consideriamo 16 g di sostanza che viene sciolta in un solvente A (mobile e più leggero) e utilizziamo un egual volume di un secondo solvente, B (fisso e più pesante), immiscibile col primo. Supponendo  $k=1$  (cioè che la sostanza si ripartisce uniformemente nei due solventi).



**Figura 1.32** Meccanismo della ripartizione.

Fig: Meccanismo di distribuzione di un soluto con  $K=1$  fra due solventi immiscibili

Procediamo a sbattere la miscela e successivamente ad allontanare il solvente A che verrà posto in un altro imbuto separatore e conterrà una egual quantità di sostanza (8 g) che è ripartita anche nel solvente B (8g) del primo imbuto. Procedendo con altro solvente A fresco nell'imbuto con B rimasto dalla prima estrazione e facendo lo stesso con solvente B fresco nell'imbuto dove è stato trasferito A dopo la prima estrazione ci sarà una nuova ripartizione nei 2 solventi di egual quantità (4 g). Procedendo in tal senso per varie estrazioni e utilizzando solventi freschi solo negli imbusti di testa e coda e riunendo le frazioni comuni degli imbusti centrali, alla fine si nota come già dopo 4 estrazioni, il 75% del totale ( $3+3+3+3$ ) è concentrato nelle frazioni centrali, mentre il restante 25% ( $1+1+1+1$ ) è ripartito equamente nei recipienti di testa e di coda. Se si continua il processo di estrazione per ulteriori steps, la % delle frazioni centrali arriverà anche oltre il 90% di sostanza estratta.

Normalmente l'estrazione viene effettuata **ripetendo più volte la procedura (3x o 5x) con quantità piccole, piuttosto che un'unica estrazione con quantità elevata di solvente.**

ES. Supponendo di avere volume  $v_s$  (ml) di una soluzione (fase I) contenente  $p$  (gr) di sostanza da estrarre con aliquote di  $v_e$  (ml) di solvente (fase II) immiscibile. Dopo la 1° estrazione il peso di soluto che sarà estratto dalla fase I alla fase II è  $p_1$  e la concentrazione sarà  $p_1/v_e$  (gr/ml), nella fase I rimarrà la quantità  $(p-p_1)/v_s$  (gr/ml). Il coefficiente  $k$  ( $= C_1/C_2$ ) sarà:

$$\frac{p_1/v_e}{(p-p_1)/v_s} = k \quad \longrightarrow \quad p_1 = p \times \left( \frac{k v_e}{k v_e + v_s} \right)$$

Dopo la 2° estrazione con uguale  $v_e$  (ml) la porzione di sostanza estratta sarà  $p_2$  (grammi) e quindi:

$$p_2 = p_1 \cdot \frac{k v_e}{k v_e + v_s} = p \cdot \left( \frac{k v_e}{k v_e + v_s} \right)^2$$

Genericamente dopo ennesima ( $n$ ) estrazione , il peso  $p_n$  risultante nella fase II, sarà:


$$p_n = p \cdot \left( \frac{k v_e}{k v_e + v_s} \right)^n$$

In pratica si deve cercare di rendere  **$p_n$**  il più grande possibile per un dato volume estraente ( $v_e$ ) che dovrà essere piccolo ma con  **$n$**  grande.

Es.

Abbiamo una soluzione di 1 g di sostanza in 50 ml di solvente e confrontiamo un'unica estrazione con 200 ml di solvente con 4 estrazioni di 50 ml ciascuna, con  $k=1$ .

Per un'unica estrazione si ha:

$$pn = 1 \cdot \left( \frac{1 \cdot 200}{1 \cdot 200 + 50} \right)^1 = 1 \cdot \frac{200}{250} = 0.8 \text{ g}$$


Per 4 estrazioni successive di 50 ml si ha:


$$p1 = 1 \cdot \left( \frac{1 \cdot 50}{1 \cdot 50 + 50} \right)^1 = 1 \cdot \frac{50}{100} = 0.5 \text{ g}$$

$$p2 = 1 \cdot \left( \frac{1 \cdot 50}{1 \cdot 50 + 50} \right)^2 = 1 \cdot \left( \frac{50}{100} \right)^2 = \left( \frac{1}{2} \right)^2 = 0.25 \text{ g}$$

$$p3 = 1 \cdot \left( \frac{1 \cdot 50}{1 \cdot 50 + 50} \right)^3 = 1 \cdot \left( \frac{50}{100} \right)^3 = \left( \frac{1}{2} \right)^3 = 0.125 \text{ g}$$

$$p4 = 1 \cdot \left( \frac{1 \cdot 50}{1 \cdot 50 + 50} \right)^4 = 1 \cdot \left( \frac{50}{100} \right)^4 = \left( \frac{1}{2} \right)^4 = 0.062 \text{ g}$$

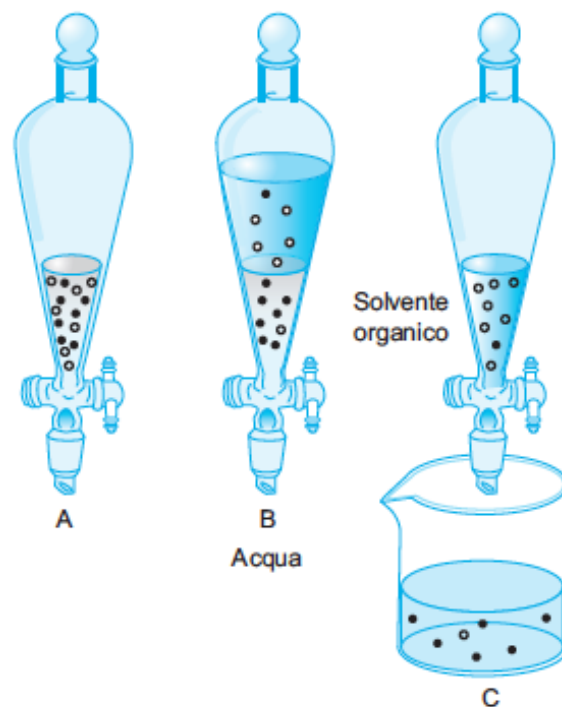
Cioè:  $pn = 0.5 + 0.25 + 0.125 + 0.062 = 0.938 \text{ g}$



## Metodologie estrattive:

### a) Estrazioni in discontinuo:

L'estrazione in discontinuo liquido-liquido si effettua con l'ausilio di imbuto separatori.



#### *Processo di estrazione:*

- A) Il solvente contiene una miscela di due molecole diverse (palline bianche e nere), che si desidera separare. Si aggiunge un secondo solvente (colorato in grigio scuro), immiscibile con il primo, e si agita energicamente.
- B) Dopo la separazione in due strati, la maggior parte delle molecole bianche (ma non tutte) risultano estratte nel nuovo solvente.
- C) Separando i due strati, le molecole bianche e nere sono state parzialmente separate.

**Figura 1.1** Imbuto separatore.

## Procedimento:

La procedura prevede normalmente 5 estrazioni della soluzione con volumi di  $\sim 1/5$  del volume da estrarre e cercando di non riempire oltre i  $2/3$  l'imbuto separatore. Dopo aver chiuso l'imbuto con il tappo, si regge l'imbuto sull'imboccatura e sul rubinetto e si dibatte energicamente per alcuni secondi e successivamente si capovolge l'imbuto con il rubinetto verso l'alto in modo da sfiatare eventuali vapori ed eliminare la sovrappressione. Si richiude il rubinetto e si ripete l'operazione, quindi si lascia a riposare in modo da favorire la stratificazione delle fasi e si apre il rubinetto in modo da scaricare la fase più densa. La fase superiore (a minor densità) verrà scaricata dall'imboccatura.

Prendendo come riferimento la densità dell'acqua pura ( $d = 1 \text{ g/ml}$ ), tutti i solventi organici con  $d < 1 \text{ g/ml}$ , come l'etere etilico ( $d = 0.713 \text{ g/ml}$ ), si stratificano sopra la fase acquosa, mentre quelli con  $d > 1 \text{ g/ml}$ , come il diclorometano ( $d = 1,325 \text{ g/ml}$ ), si raccolgono nello strato inferiore.

La scelta del solvente di estrazione viene effettuata in base a:

- *bassa tossicità;*
- *favorevole coefficiente di ripartizione;*
- *selettività di estrazione rispetto altri componenti;*
- *basso P.eb al fine di facilitare il recupero del campione per evaporazione;*
- *elevata differenza di densità per avere una rapida separazione delle fasi.*

Inconveniente molto comune è la formazione di emulsioni, specie in presenza di sostanze molto basiche; tra le soluzioni adottate, quella più comune consiste nell'aggiungere una soluzione satura di NaCl (effetto salatura) in modo da sfavorire l'associazione estraente-acqua.

Nel caso di sospensioni di materiale solido più o meno fine, si può filtrare su carta e poi riestrarre nuovamente in imbuto separatore.

## b) Estrazioni in continuo:

L'estrazione in continuo liquido-liquido e liquido-solido si effettua con l'ausilio di determinati estrattori detti *perforatori*. Essi consentono l'uso di una modesta quantità di solvente che viene fatto evaporare e condensare in un ciclo continuo permettendo così l'estrazione in continuo del soluto, sia esso in soluzione (liq-liq), sia esso in fase solida (liq-sol).

Il più comune estrattore liq.-sol. è il Soxhlet (Fig.), che viene ampiamente utilizzato in fitochimica, ma anche nei laboratori clinico-tossicologici per estrarre materiale a natura lipofila da tessuti o organi.



Il solvente bolle nel pallone e il vapore passa attraverso il tubo esterno nella zona superiore ove condensa. Da qui ricade in un serbatoio che contiene un ditale di carta da filtro in cui è posto il campione. Quando il livello di liquido è sufficientemente alto, viene automaticamente richiamato attraverso il sifone più interno a forma di U ritornando nel pallone di partenza.

Figura 1.2 Estrattore di Soxhlet.

Utili qualora si voglia estrarre principi attivi contenuti in una matrice solida, quindi molto usati nell'estrazione di sostanze da piante, in fitochimica.

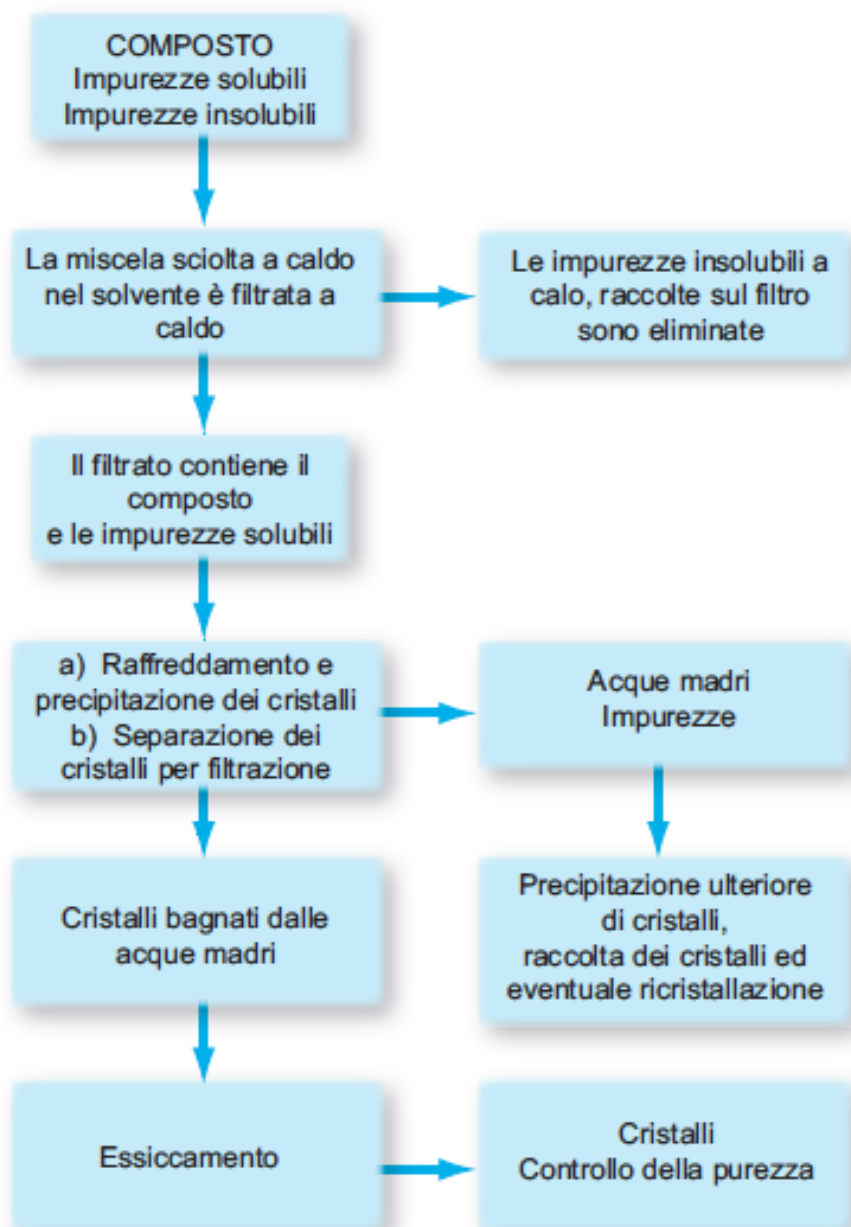
## B. CRISTALLIZZAZIONE

La cristallizzazione è un processo che consente di separare un composto solido da impurezze presenti in quantità non elevata che possono provenire dall'alterazione del composto stesso, dal procedimento di sintesi, da procedimenti estrattivi da prodotti di origine naturale, da altre possibili fonti. In genere un composto può essere cristallizzato quando è presente in quantità almeno cinque volte superiore alle impurezze che contiene.

Normalmente questa operazione si esegue sciogliendo a caldo il materiale in esame in un piccolo volume di un solvente in cui è insolubile o poco solubile a temperatura ambiente per ottenere una soluzione satura. La soluzione satura è filtrata a caldo per separare sostanze insolubili eventualmente presenti e lasciata raffreddare lentamente. La ricristallizzazione del composto si realizza più o meno velocemente e spesso richiede tempi abbastanza lunghi (ad esempio “overnight”) per completarsi. Il raffreddamento lento consente ai cristalli di crescere senza inglobare le impurezze. Dopo l'isolamento dei cristalli per filtrazione ed essiccamento, si controlla la loro purezza con l'impiego di varie tecniche analitiche (punto di fusione, TLC, altri metodi cromatografici, metodi spettroscopici).

Nello Schema 1 sono delineate le varie fasi coinvolte nel procedimento di separazione e purificazione di un composto mediante la ricristallizzazione con solventi.

**SCHEMA 1.1**  
Operazioni coinvolte nel processo di cristallizzazione.



Le condizioni necessarie per effettuare una cristallizzazione da solvente sono le seguenti:

- Il composto da cristallizzare dev'essere più solubile nel solvente a caldo che a temperatura ambiente.
- Il composto non deve reagire con il solvente.
- Le impurezze devono essere solubili nel solvente anche a freddo.
- Le impurezze che fossero insolubili anche a caldo devono essere rimosse per filtrazione (a caldo).
- Il solvente non dev'essere troppo volatile in modo da evitare che cristallizzino anche le impurezze per la rapida evaporazione del solvente.
- Il composto deve precipitare allo stato cristallino.

Nella tabella seguente sono riportati i solventi più comunemente usati per la cristallizzazione. La scelta del solvente, per composti non descritti in letteratura, si basa sulle conoscenze delle possibili interazioni chimico-fisiche tra il composto ed il solvente. Molto spesso, però, si opera per tentativi a partire dal solvente con caratteristiche chimico-fisiche più simili al composto da cristallizzare.

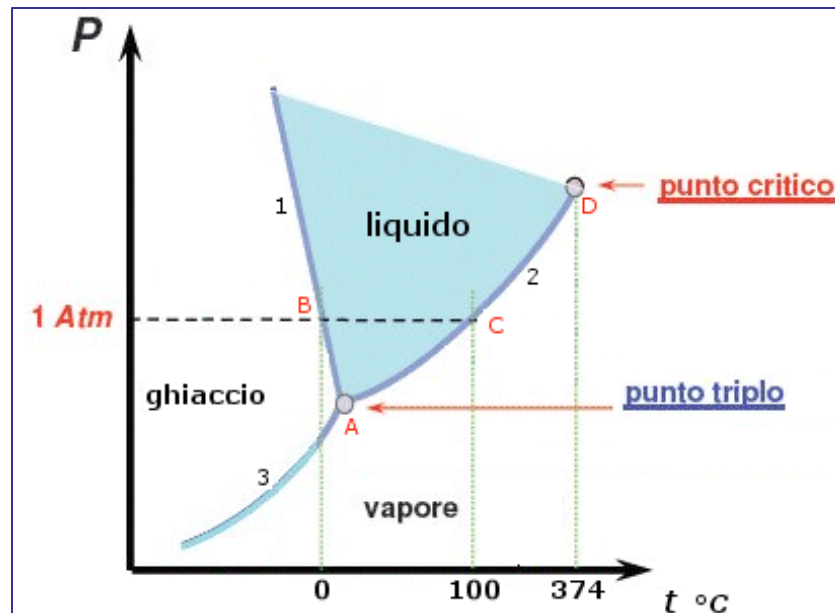
A volte, quando un composto risulta troppo solubile in alcuni solventi e troppo poco in altri, è opportuno utilizzare una coppia di solventi purché miscibili tra loro in tutte le proporzioni.

**Tabella 1.1** Solventi frequentemente usati per la cristallizzazione.

| SOLVENTE            | P.TO<br>EBOLLIZIONE<br>(°C) | SOLVENTE                 | P.TO<br>EBOLLIZIONE<br>(°C) |
|---------------------|-----------------------------|--------------------------|-----------------------------|
| Acetato di etile    | 78                          | Esano                    | 68                          |
| Acetone             | 56                          | Etanolo                  | 78                          |
| Acetonitrile        | 81.6                        | Etere di petrolio        | 37-63                       |
| Acido acetico       | 118                         | Etere etilico            | 35                          |
| Acqua               | 100                         | Etilmetilchetone         | 80                          |
| Cicloesano          | 80                          | Metanolo                 | 65                          |
| Cloroformio         | 61                          | Tetracloruro di carbonio | 77                          |
| Cloruro di metilene | 41                          | Piridina                 | 115                         |
| Diossano            | 101                         | Tetraidrofurano          | 66                          |

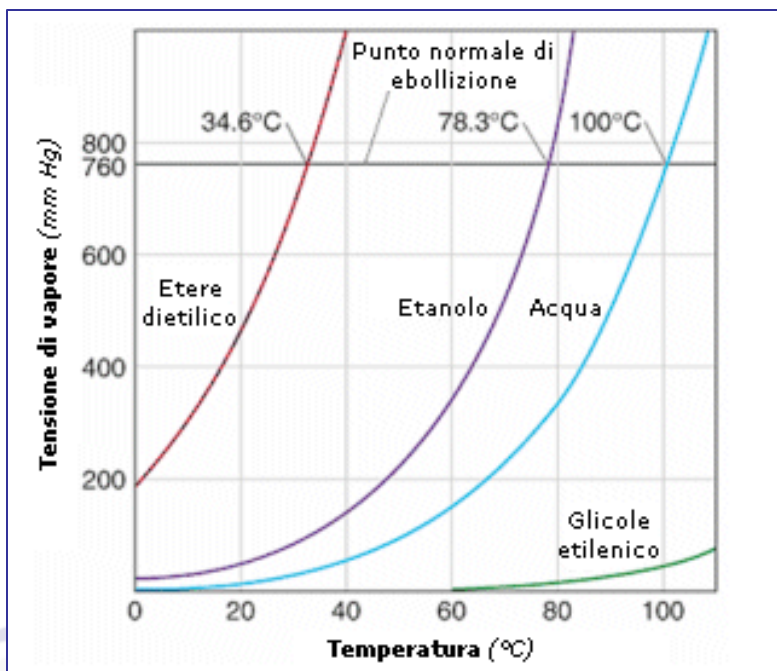
## C. DISTILLAZIONE

La distillazione è una tecnica che permette di separare tra loro componenti di una miscela formata da 2 o più sostanze che possono essere tra di loro sia miscibili che immiscibili (parzialmente o totalmente). Essi vengono fatti passare tramite **ebollizione** dallo stato liquido allo stato di vapore e, successivamente, **condensarne i vapori e raccogliere il condensato** in un altro recipiente.



La vaporizzazione parziale della miscela produce dei vapori che una volta separati e condensati danno una nuova miscela liquida (distillato) generalmente a composizione diversa di quella della miscela iniziale, con un aumento della concentrazione del componente più volatile (a più bassa temperatura di ebollizione). (Regola di Konovaloff)

Concetto chiave è la **tensione di vapore**, ovvero *la pressione che il vapore esercita quando è in equilibrio dinamico con il proprio liquido*. Per un liquido “puro” il suo valore è costante ad una certa temperatura ed aumenta con essa. Può essere espressa come VOLATILITA’.



Tendenza delle molecole a “sfuggire” dalla fase liquida (o solida) per la fase aeriforme. Minore è la pressione e maggiore è la tensione di vapore (e minore sarà la T° di ebollizione).

## LEGGE DI RAOULT

Per una soluzione IDEALE ad un componente, la pressione parziale nella miscela gassosa è pari alla pressione parziale del componente puro ( $P^\circ_i$ : tensione di vapore) e alla sua frazione molare ( $x_i$ ) nella soluzione:

$$P_i = P^\circ_i \cdot \chi_i$$

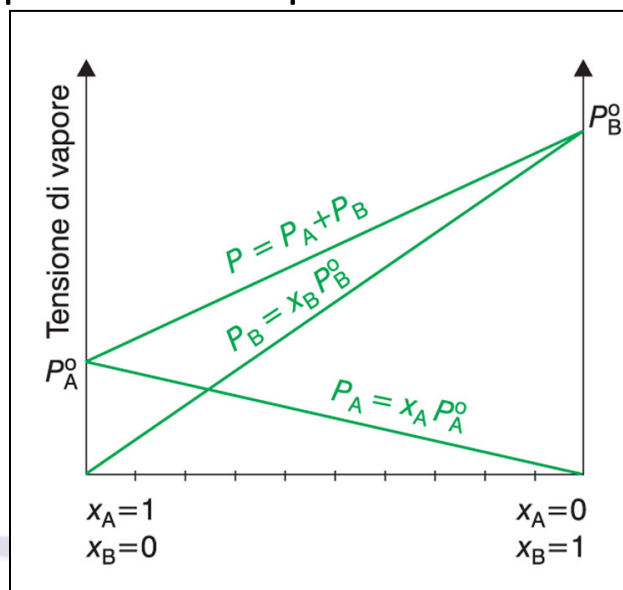
## SOLUZIONI IDEALI A DUE COMPONENTI VOLATILI

LE FORZE INTERMOLECOLARI SONO IDENTICHE A QUELLE INTRAMOLECOLARI (**A-B**= A-A e B-B) per cui le pressioni di vapore dei componenti si sommano:

Legge di Dalton:  $P_{\text{tot.}} = P_a + P_b$

Si può applicare quella di Rault

per cui:  $P_{\text{tot.}} = P^\circ_a \chi_a + P^\circ_b \chi_b$

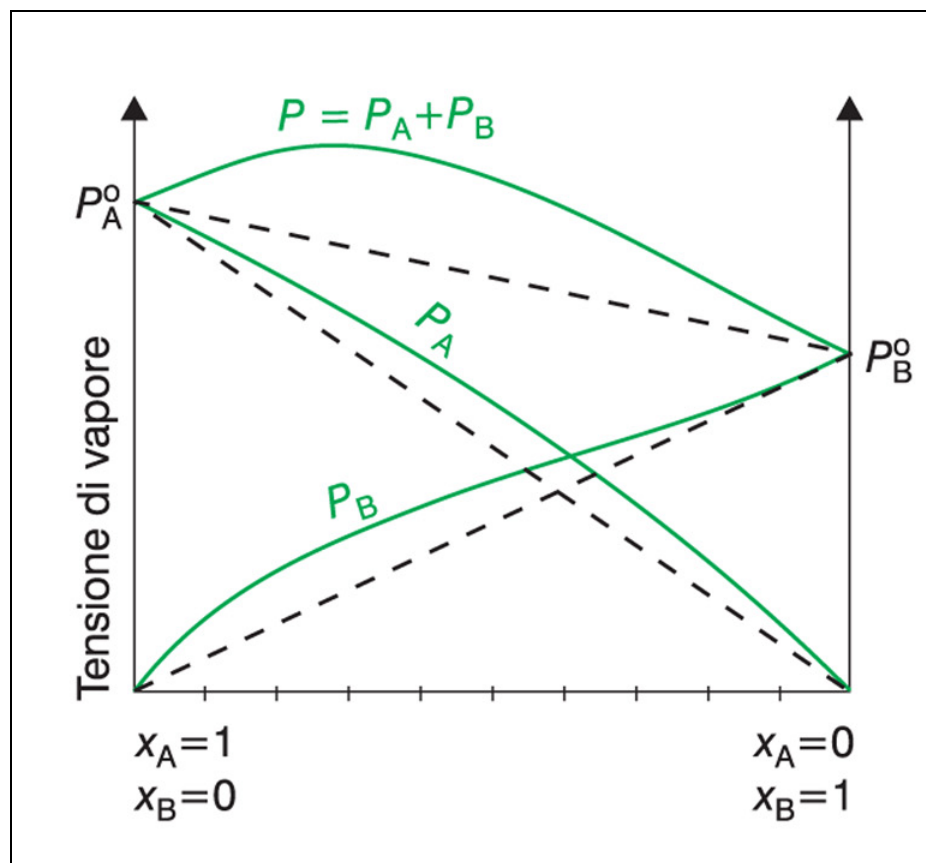


## SOLUZIONI NON IDEALI CON DEVIAZIONE POSITIVA

LE FORZE INTERMOLECOLARI SONO INFERIORI A QUELLE INTRAMOLECOLARI (**A-B** < A-A e B-B) per cui le pressioni di vapore dei componenti:

Legge di Dalton:  $P_{\text{tot.}} = P_a + P_b$

Si può applicare quella di Roulth per cui:  $P_{\text{tot.}} = P_a^\circ \chi_a + P_b^\circ \chi_b$



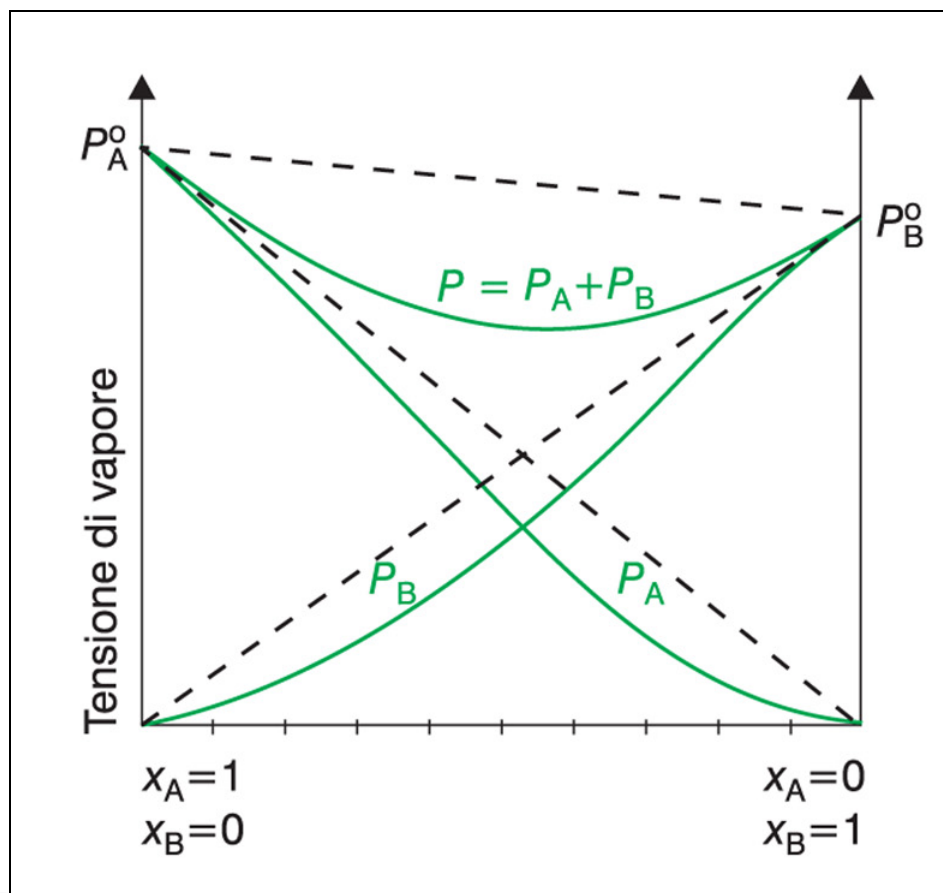
## SOLUZIONI NON IDEALI CON DEVIAZIONE NEGATIVA

LE FORZE INTERMOLECOLARI SONO MAGGIORI A QUELLE INTRAMOLECOLARI (**A-B** > A-A e B-B) per cui le pressioni di vapore dei componenti:

Legge di Dalton:  $P_{\text{tot.}} = P_a + P_b$

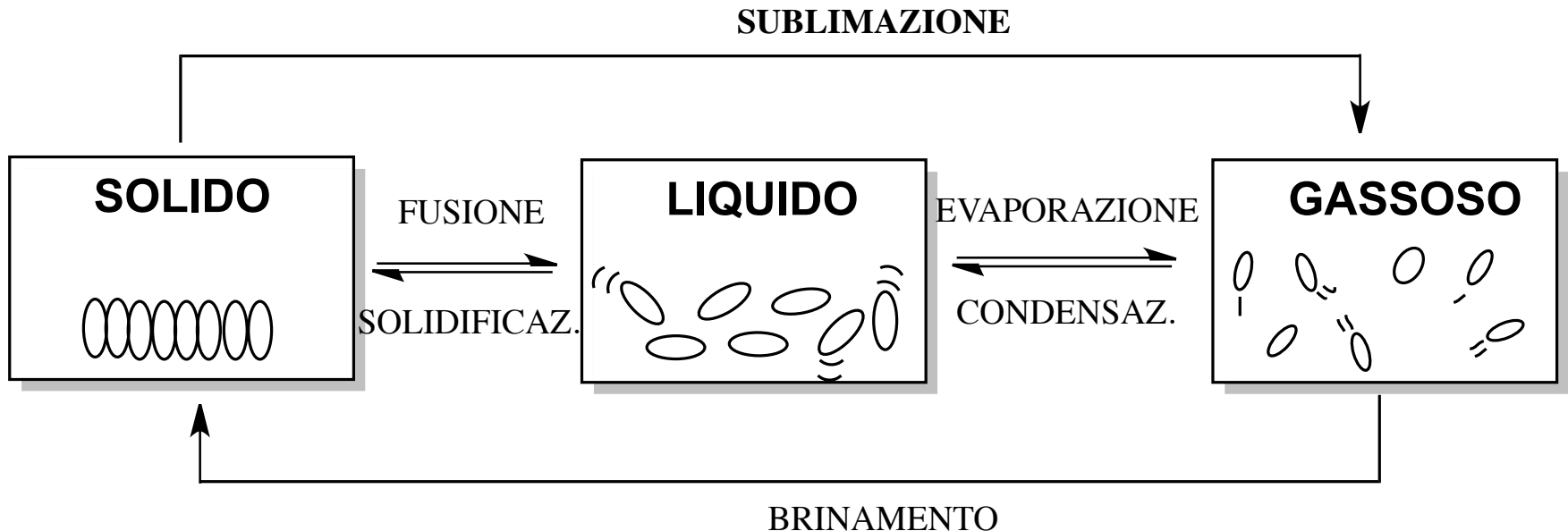
Si può applicare quella di Rault

per cui:  $P_{\text{tot.}} = P_a^\circ \chi_a + P_b^\circ \chi_b$



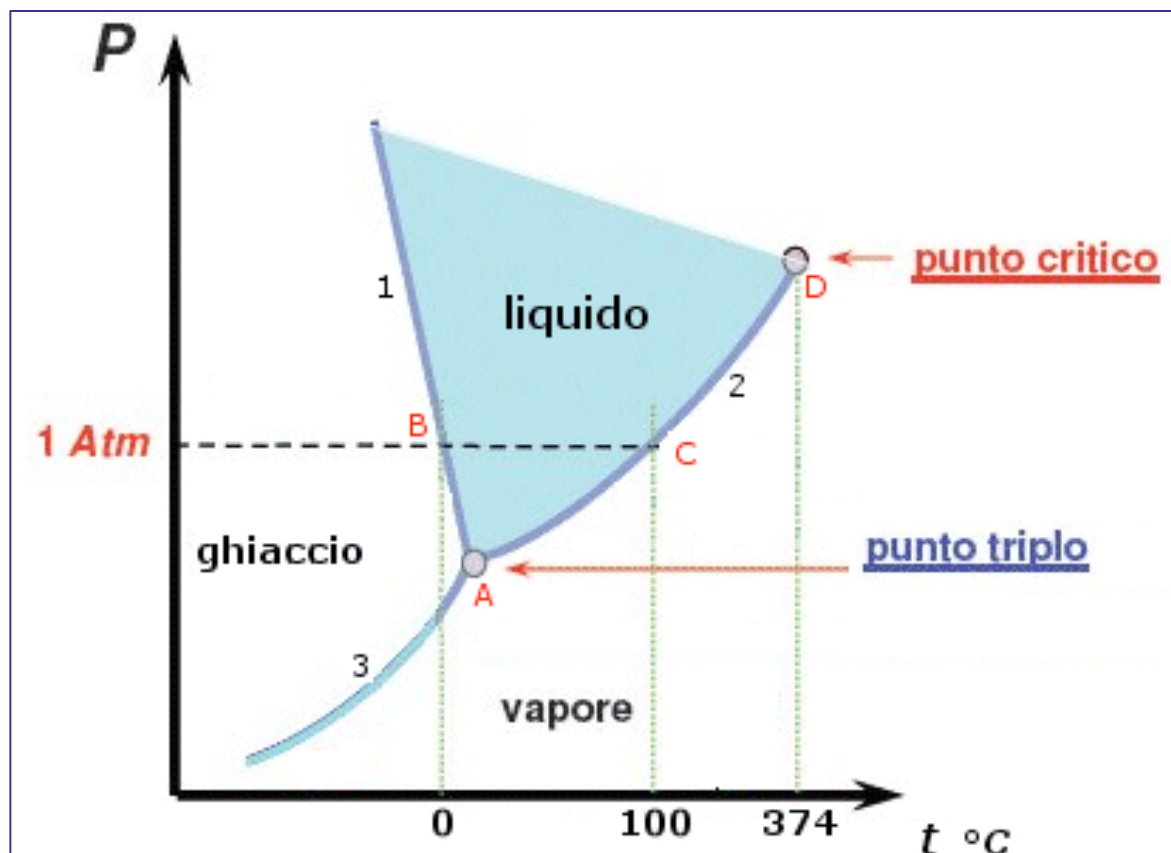
## D. SUBLIMAZIONE

La sublimazione rappresenta la transizione di fase dallo stato solido a quello aeriforme, senza che ci sia fusione (cioè passaggio attraverso la fase liquida intermedia). Ciò può avvenire in determinate condizioni di temperatura e pressione.



N.B.: Il processo inverso è detto “brinamento”.

Se consideriamo il diagramma di stato dell' $\text{H}_2\text{O}$ :



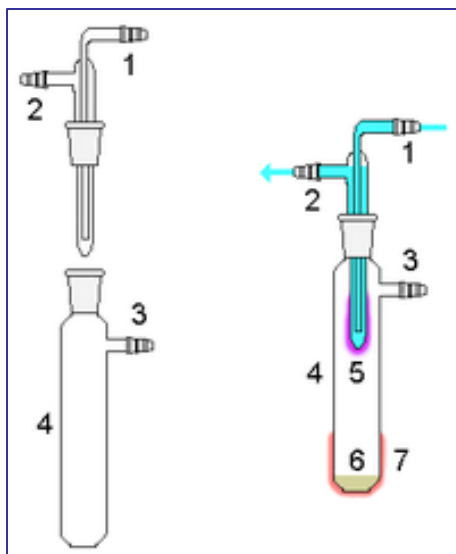
Il passaggio di stato solido-vapore, avverrà al di sotto della  $T^\circ = 0.01^\circ\text{C}$  ( $P = 4.58$  mm Hg), cioè avviene con acquisto di calore: endotermico!

<http://www.larapedia.com/chimica/chimica-generale-8.html>

La sublimazione avviene più facilmente in sostanze che hanno basse energie di legame intramolecolare (iodio, canfora, ghiaccio secco). Tali sostanze tendono a sublimare spontaneamente ( $\sim 20^{\circ}\text{C}$ ), ma potrebbero anche fondere (passaggio solido-liquido) se si esercitasse sulla loro superficie una certa pressione.

La sublimazione rappresenta un sistema di purificazione di sostanze allo stato solido che sublimano, da altre sostanze che invece non sublimano.

### *Es. di Sublimatore*



1 e 2 entrata/uscita liquido di raffreddamento.

3 Linea del vuoto.

4 Camera di sublimazione.

5 Sublimato.

6 Sostanza da purificare.

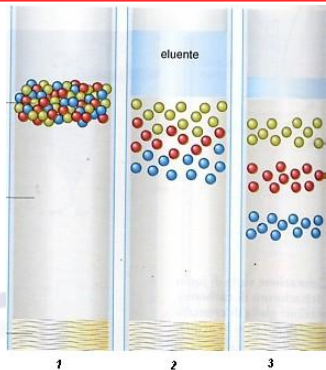
7 Riscaldamento esterno.

## E. CROMATOGRAFIA

Risale agli inizi del XX secolo come tecnica per la separazione di pigmenti fogliari, inventata dal botanico russo Mikhail Semenovitch Tswett.

Egli intendeva separare i pigmenti presenti nella clorofilla; fece un estratto di foglie verdi in etere di petrolio, lo depositò in testa ad una colonna di vetro impaccata con carbonato di calcio ed elui, (cioè versò in continuo) con solfuro di carbonio: i vari pigmenti si separano in bande colorate, in particolare clorofilla A e B, carotene e xantofilla.

Tswett chiamò questa tecnica *cromatografia* dal greco *scrittura del colore*.



# Basi del procedimento cromatografico

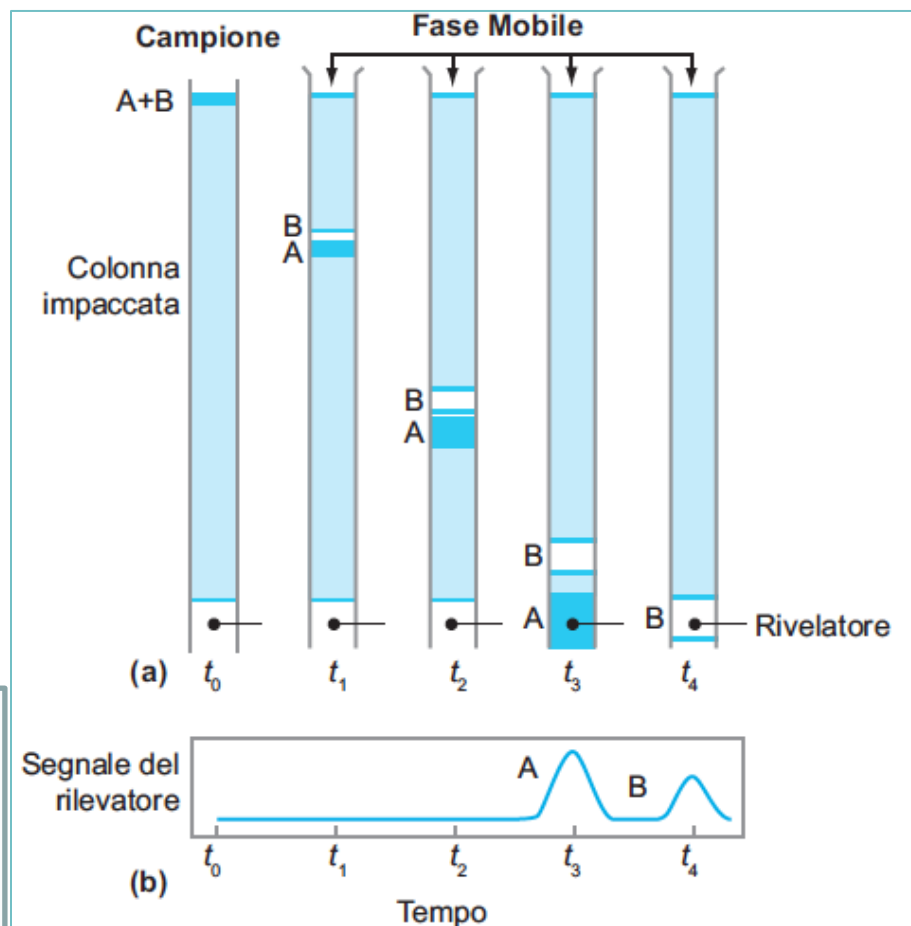
- il campione è introdotto nella fase mobile, che può essere un gas, un liquido o un fluido supercritico
- la fase mobile viene fatta eluire in continuo attraverso la fase stazionaria, che *deve essere immiscibile* nell'eluente
- la fase stazionaria (liquida o solida) si trova all'interno di una *colonna* oppure è supportata su una *superficie piana*
- la fase mobile e la fase stazionaria sono scelte in modo che i componenti della miscela da separare si distribuiscano tra le due fasi:
  - i componenti più affini alla fase stazionaria passeranno più tempo in questa fase, quindi si sposteranno più lentamente attraverso il sistema;
  - i componenti più affini alla fase mobile si sposteranno invece più velocemente;
- la separazione dei componenti avviene in quanto ogni sostanza ha una distribuzione caratteristica tra le due fasi (costante di ripartizione  $K = C_s/C_m$ )

# Visualizzazione della separazione

Ponendo all'uscita della colonna un rivelatore che misuri la concentrazione del soluto nell'*eluato* (cioè la fase mobile che esce dalla colonna) e riportando il segnale in funzione del tempo si può ottenere un *cromatogramma*.

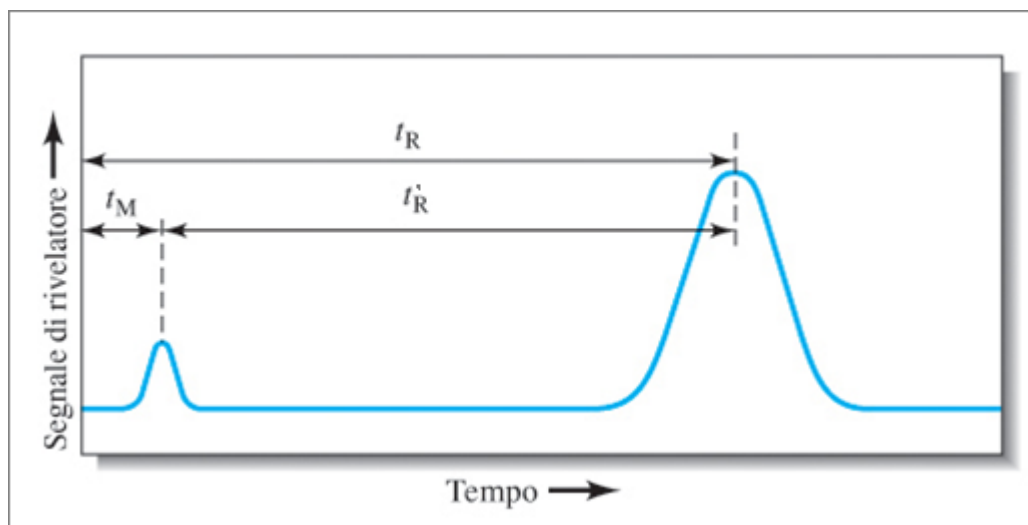
La posizione dei picchi sull'asse dei tempi, o *tempo di ritenzione*, serve per identificare i componenti del campione.

L'area sottesa dai picchi è proporzionale alla quantità di ogni singolo componente e può essere utilizzata a scopo quantitativo.



**Figura 1.24** (a) Esempio di un'eluizione cromatografica di due componenti (A e B) e (b) loro rivelazione (cromatogramma).

# Tempo di ritenzione e Volume di ritenzione



Il **tempo di ritenzione**  $t_R$  è il tempo che impiega un componente della miscela iniettata ad uscire dalla colonna o, tecnicamente, ad essere rivelato come picco dal detector. Il tempo morto ( $t_M$ ) è invece il tempo impiegato da una sostanza che non viene praticamente trattenuta dalla fase stazionaria e normalmente corrisponde al tempo di ritenzione del solo eluente. Di solito si utilizza il **tempo di ritenzione corretto** ( $t'_R$ ) che corrisponde all'effettivo tempo che una sostanza impiega in colonna relativamente all'eluente:

$$t'_R = t_R - t_M$$

La misura dell'affinità che una sostanza presenta nei confronti della fase mobile e di quella stazionaria è espressa dal noto Coefficiente di ripartizione, **K**:

$$K = \frac{C_S}{C_M}$$

K è un'importante grandezza termodinamica perché dipende solo dallo stato del sistema cromatografico e cioè dalla natura della fase mobile e stazionaria, nonché dalla temperatura di lavoro.

- Analogamente al  $t_R$ , si utilizza più spesso il Volume di Ritenzione,  $V_R$ , che è dato dal prodotto del tempo di ritenzione e la velocità del flusso di eluizione:

$$V_R(ml) = t_R(min) \times f_V(ml/min)$$

Mentre il volume di una sostanza NON trattenuta è chiamato volume morto,  $v_M$ :

$$V_M(ml) = t_M(min) \times f_V(ml/min)$$

## Fattore di ritenzione (o di capacità): $k'$

Considerando le moli di sostanza anziché la concentrazione, si otterrà una costante:

$$k' = \frac{n_S}{n_M}$$

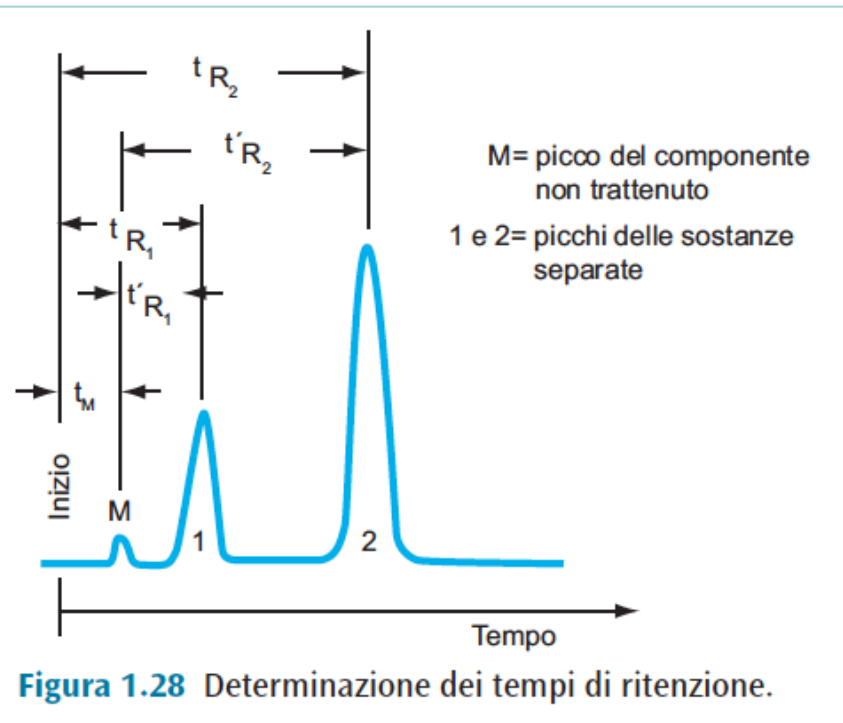
$n_S$ : n° moli sostanza nelle fase stazionaria  
 $n_M$ : n° moli sostanza nelle fase mobile

Essendo  $n_S = C_S V_S$  e  $n_M = C_M V_M$ , La correlazione tra  $K$  e  $k'$  sarà:

$$k' = \frac{C_S V_S}{C_M V_M} = K \cdot \frac{V_S}{V_M}$$

$K'$  è chiamata Fattore di Capacità (o di ritenizione) e tiene conto del coefficiente di ripartizione e dei volumi della fase mobile e stazionaria.

E' meglio espressa dai tempi di ritenzione o dai rispettivi volumi.



### Determinazione dei tempi di ritenzione:

M: picco del componente non trattenuto (eluente).

1 e 2: picchi di sostanze separate.

Il rapporto tra il tempo di ritenzione corretto ( $t'_R$ ) di una sostanza ed il tempo morto dell'eluente ( $t_M$ ) rappresenta il cosiddetto fattore di ritenzione (o di capacità),

$$(\text{fattore di capacità}) k' = \frac{t_R - t_M}{t_M} = \frac{t'_R}{t_M}$$

che rappresenta l'aspetto qualitativo dell'analisi cromatografica in quanto diverso per ciascuna sostanza.

Il parametro  $k'$  è anche un parametro cinetico. Infatti esso esprime il tempo ( $t'_R$ ) che ogni sostanza trascorre nella fase stazionaria rispetto al tempo ( $t_M$ ) che essa trascorre nella fase mobile.  $K'$  esprime in quale misura una determinata sostanza viene ritardata dalla fase stazionaria ed esprime così la distribuzione fra le due fasi di una specie chimica in una chiave dinamica. Il fattore di ritenzione dipende anche dalle caratteristiche dell'impaccamento, dalla granulometria e dallo spessore della fase stazionaria. Non dipende da variabili quali la lunghezza della colonna e il flusso e quindi può essere usato per confrontare le prestazioni di due colonne diverse a parità di eluente.

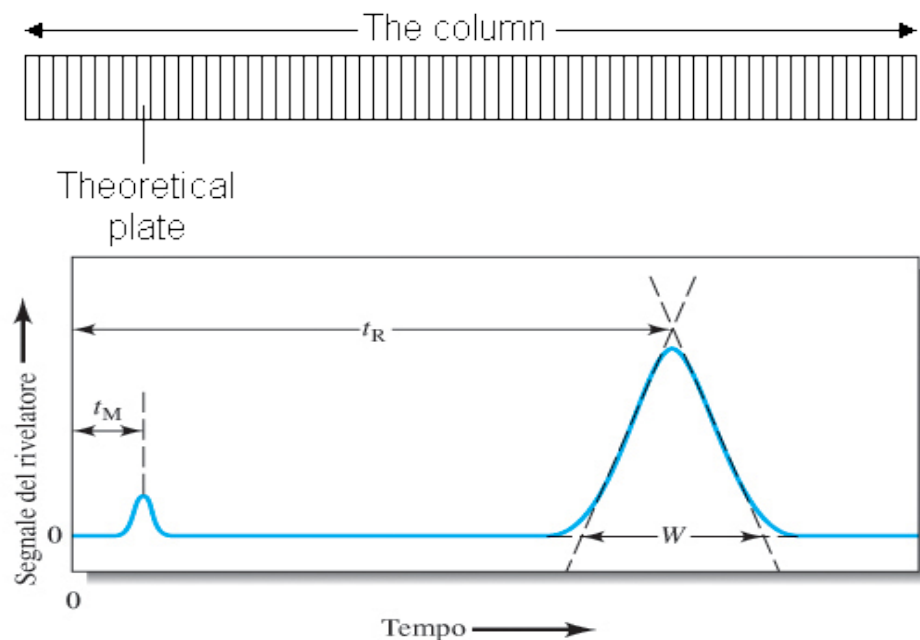
Se consideriamo i volumi di ritenzione anziché i tempi,  $K'$  può essere scritta come:

$$(\text{fattore di capacità})k' = \frac{V_R - V_M}{V_M} = \frac{V'_R}{V_M}$$

# Piatti teorici

Per descrivere il processo cromatografico è utilizzata una similitudine derivante dalla teoria della distillazione frazionata. Il sistema cromatografico è immaginato simile ad una colonna di distillazione, cioè composta da una serie di strati sottili chiamati *piatti teorici*; in ognuno di questi microelementi della colonna si realizza l'equilibrio di distribuzione del soluto tra fase stazionaria e fase mobile. Lo spostamento del soluto lungo la colonna è dovuto all'azione dinamica della fase mobile.

I termini *numero di piatti teorici (N)* e *altezza del piatto (HETP, Height Equivalent to Theoric Plate o semplicemente H)* sono comunemente utilizzati in cromatografia per quantificare le prestazioni dei sistemi cromatografici.

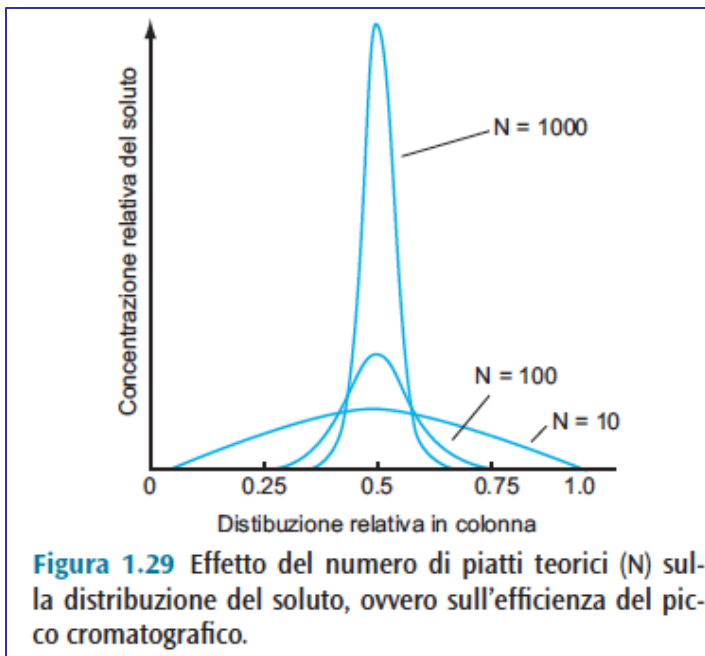


$$N = 16 (t_R/W_b)^2$$

$$\text{HETP (H)} = L / N$$

L = lunghezza colonna

Lo spostamento del soluto lungo la colonna è dovuto all'azione dinamica della fase mobile e quindi **N** riflette in numero di volte in cui il soluto si ripartisce tra le due fasi durante il passaggio attraverso una colonna. Risulta chiaro che maggiore sarà **N**, migliore sarà l'efficienza cromatografica (Fig.); **N** fornisce un'indicazione del buon impaccamento della colonna.



Effetto del numero di piatti teorici (N) sulla distribuzione del soluto, ovvero sull'efficienza del picco cromatografico.

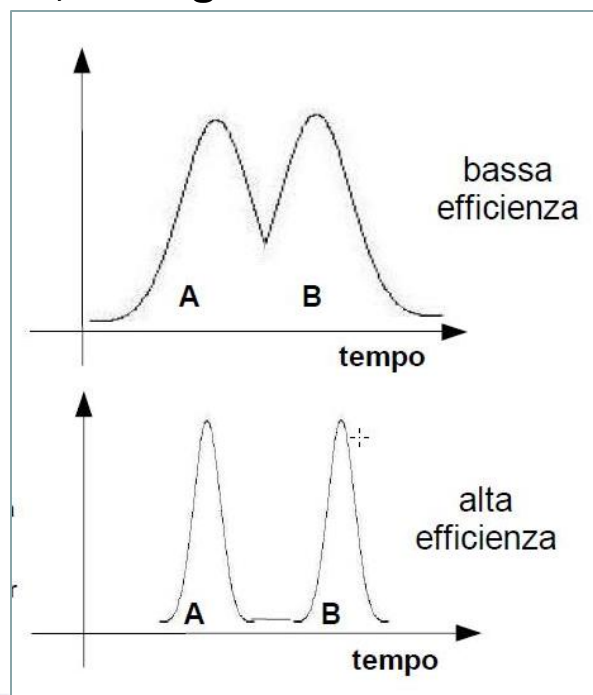
$$H=L/N$$

Una colonna è tanto più efficiente (nei confronti di una determinata specie chimica), e fornisce picchi tanto più stretti, quanto minore è il valore di **H** (o grande **N**).

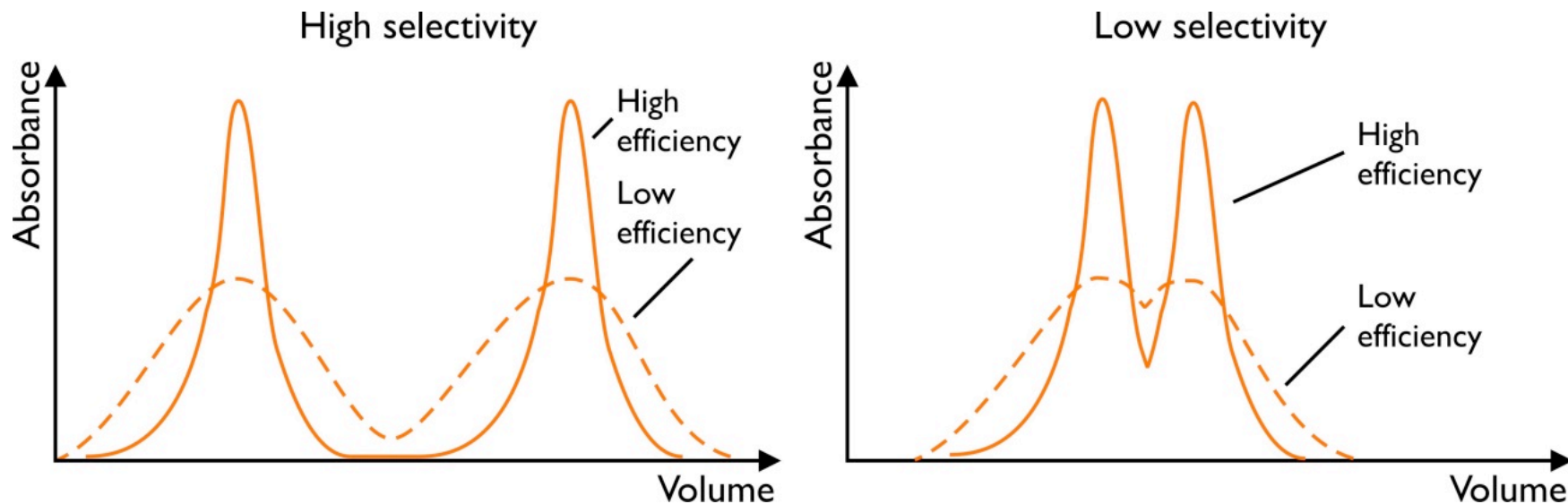
# Efficienza e Selettività

L'**efficienza** indica la capacità di un sistema cromatografico di eluire tutte le particelle di una data specie chimica con la stessa velocità, in modo da formare bande strette, che forniscono ***picchi molto stretti***. Il parametro più semplice con cui esprimere l'efficienza è *la larghezza alla base del picco* ( $w_b$ ), che in genere è diversa per ogni specie chimica in un dato sistema cromatografico. Viene espressa tramite **N**, o meglio con **H**.

L'efficienza è tanto migliore quanto **N** è maggiore, ovvero quanto **H** è minore.



La **selettività** è definita come la capacità di una colonna di fornire **picchi distanziati** ed è un fattore termodinamico che dipende dalla temperatura e dalla natura della fase stazionaria e mobile.



E' definita dal fattore di selettività  $\alpha$  che è il rapporto fra i tempi di ritenzione di due sostanze o, meglio, fra i tempi di ritenzione corretti di due sostanze (es. A e B):

$$\text{(fattore di selettività)} \alpha_A^B = \frac{t'_{R(B)}}{t'_{R(A)}} \quad \text{o anche:} \quad \alpha_A^B = \frac{k'_B}{k'_A} = \frac{K_B}{K_A}$$

Il fattore di selettività deve essere maggiore di 1,2.

# Risoluzione cromatografica

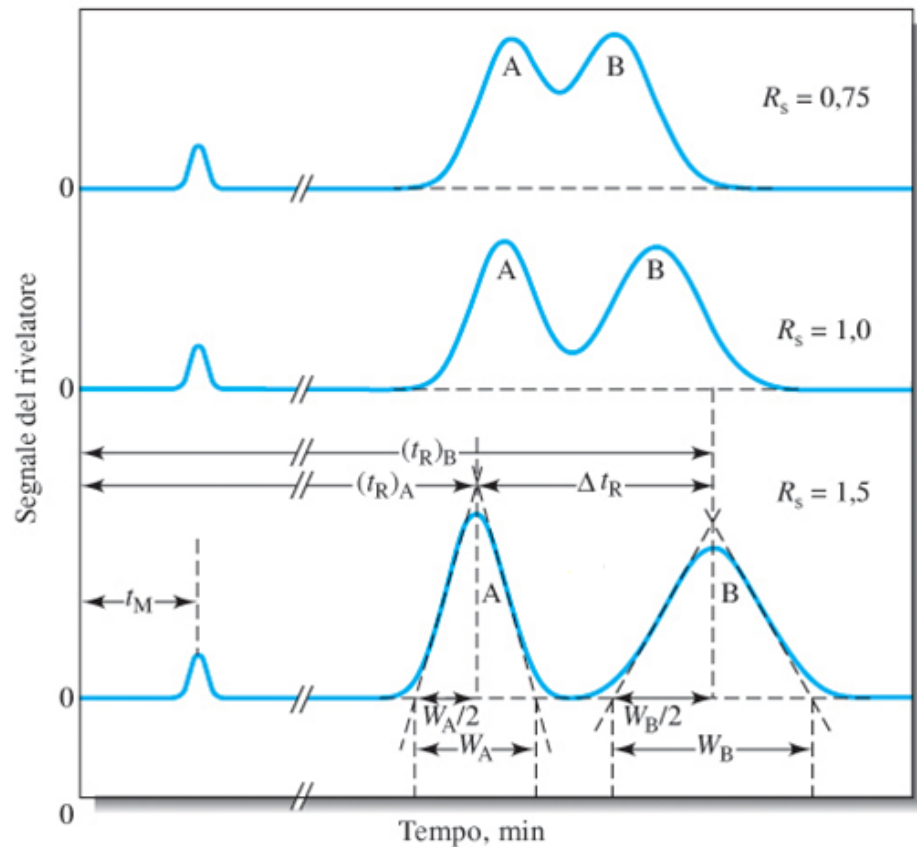
Questo fattore tiene conto sia della selettività che dell'efficienza, e indica il grado di effettiva separazione ottenuto per due analiti con caratteristiche simili, in un processo cromatografico.

Viene espressa dalla relazione:

$$R = \frac{t_{R(B)} - t_{R(A)}}{\frac{W_{(A)}}{2} + \frac{W_{(B)}}{2}}$$

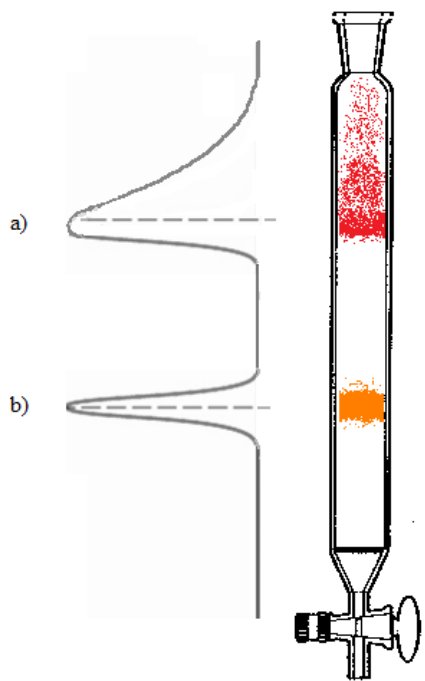
$$R = \frac{2\Delta t}{W_{(A)} + W_{(B)}}$$

Se la risoluzione non è sufficiente ( $R < 1$ ), i due picchi non possono essere quantificati in maniera corretta.



# Capacità

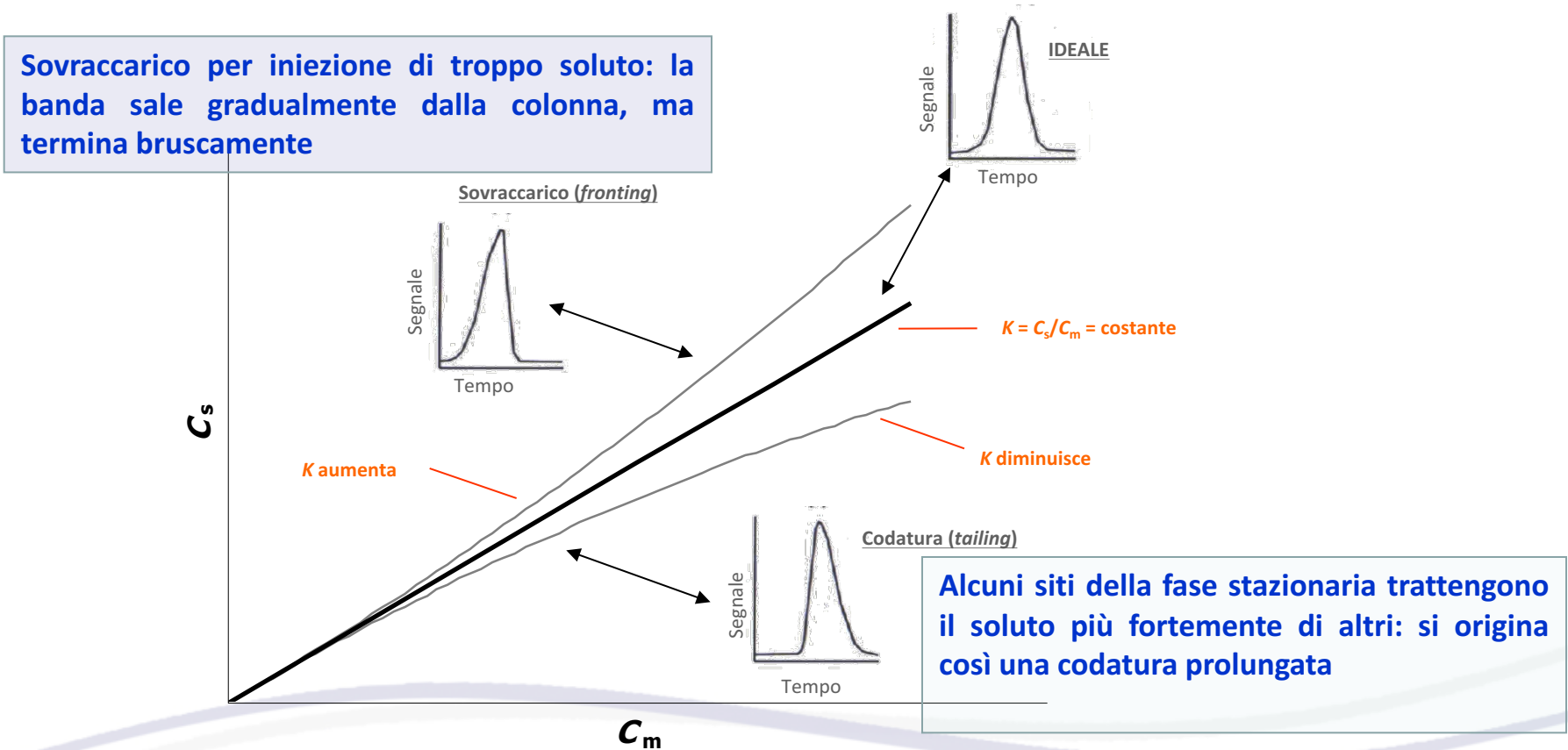
Un altro parametro cromatografico da considerare è la **capacità**, quale misura della quantità massima di materiale che la fase stazionaria può “accettare” per realizzare una buona separazione. E' espressa in milligrammi di campione per grammo di fase stazionaria. Se si introduce un'eccessiva quantità di campione nel sistema cromatografico si può verificare principalmente il fenomeno dell'assimmetria delle bande; è quindi necessario introdurre una quantità minima di analita o ridurre la concentrazione iniziale.



- a) Picco asimmetrico dovuto alla quantità elevata di materiale=banda codata”.
- b) Picco simmetrico e ben risolto.

## Nella realtà:

Il coefficiente di ripartizione  $K = C_s/C_m$  dovrebbe essere costante ed indipendente dalla concentrazione del soluto. Se così fosse avremmo bande simmetriche di forma gaussiana. Nelle colonne reali tuttavia  $K$  cambia all'aumentare della concentrazione del soluto e le bande si presentano codate.



## QUINDI:

È utile mettere in relazione **R** con il numero di piatti teorici della colonna, i fattori di selettività ( $\alpha$ ) e i fattori di ritenzione ( $K$ ) dei due analiti. L'equazione che correla tutti questi parametri è la seguente:

$$R = \frac{\sqrt{N}}{4} \left( \frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left( \frac{1 + k'_B}{k'_B} \right)$$

**Per ottenere un'alta risoluzione, è necessario massimizzare i 3 termini.**


Un aumento del numero di piatti teorici (N), aumentando la lunghezza della colonna, porta ad un aumento nel tempo di ritenzione, ma può provocare anche un aumento della larghezza della banda.

In alternativa per aumentare il numero di piatti si può ridurre l'altezza del piatto teorico (H) riducendo la dimensione delle particelle della fase stazionaria.

La separazione può essere migliorata controllando il fattore di capacità (K') variando la composizione della fase stazionaria e il carico iniziale di soluto.

## Interazione soluto-fasi

Le interazioni che si verificano tra le sostanze da separare e le due fasi (mobile e stazionaria) sono deboli: se così non fosse non ci sarebbe trattenimento sulla fase stazionaria oppure, al contrario, eluizione. Sono sfruttate a scopo separativo le seguenti interazioni:

- legami a idrogeno
  - interazioni dipolo-dipolo
  - interazioni dipolo-dipolo indotto
  - formazione di composti di interazione
  - attrazione coulombiana
  - interazioni steriche
- 
- Forze di van der Waals

In tutte queste interazioni svolge un ruolo solitamente decisivo la polarità delle due fasi. Spesso possono essere presenti più tipi di interazione nello stesso processo cromatografico.

# Tecniche cromatografiche

In base ai tipi di interazione visti prima, le tecniche cromatografiche si dividono in:

**ADSORBIMENTO:** la fase stazionaria è un solido polverizzato; sulla superficie dei granuli si trovano siti attivi che possono stabilire dei legami deboli con le molecole della miscela da separare.

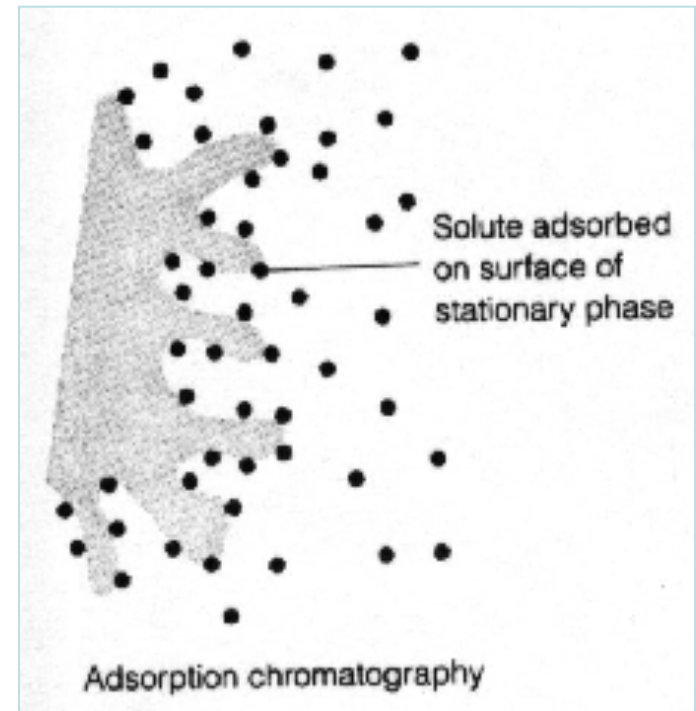
**Cromatografia di adsorbimento:**

se la fase mobile è un gas:

- . Cromatografia gas-solido (GSC).

se è un liquido:

- . Cromatografia liquido-solido (LSC).



### A livello microscopico:

Se esaminiamo il campo di forze che riguarda gli atomi più esterni della superficie del granulo adsorbente, si può constatare come essi non possiedono un intorno elettrostaticamente uniforme e creano quindi un campo di forze residuo capace di sbilanciare le cariche elettriche che vengono a contatto, respingendo quelle di segno uguale ed attraendo quelle di segno opposto più o meno efficacemente, in dipendenza del momento dipolare di cui esse sono dotate. Sulle molecole prive di momento dipolare, in prossimità del campo superficiale dell'adsorbente si verrà così a creare un **momento dipolare indotto** il cui valore dipenderà dalle dimensioni della molecola, oltre alle caratteristiche dell'adsorbente. La molecola può così venir adsorbita, pur se meno saldamente rispetto a quelle dotate di momento dipolare proprio.

Durante la fase di eluizione, l'eluente va a sostituirsi, per azione di massa, al componente adsorbito sul centro attivo in modo dipendente dal grado di adsorbimento del composto e dalla polarità dell'eluente. Si verifica così un processo continuo di adsorbimento-deadsorbimento che interessa ciascun componente la miscela, i quali migreranno con velocità relative differenti in funzione del grado di affinità per la fase stazionaria.

I materiali più comuni per le fasi stazionarie solide sono la **silice** e l'**allumina**. Si tratta di sostanze polari che quindi tratterranno maggiormente composti a natura polare, mentre molecole meno polari saranno poco trattenute e verranno eluite per prime.

➤ Una **fase stazionaria** efficiente deve avere le seguenti caratteristiche:

- essere selettiva per molte sostanze;
- essere riproducibile;
- evitare legami covalenti irreversibili;
- inerzia chimica nei confronti dei solventi usati come fase mobile;
- avere elevata superficie adsorbente;
- granulometria il più uniforme possibile.

Il potere adsorbente di una fase stazionaria viene misurato dalla quantità di acqua libera che è in grado di adsorbire.

**Tabella 1.4**

| Potere adsorbente |                       |            |
|-------------------|-----------------------|------------|
| Forte             | Medio                 | Debole     |
| Allumina          | Idrossido di calcio   | Cellulosa  |
| Gel di silice     | Idrossido di magnesio | Talco      |
| Florisil          | Carbonato di calcio   | Amido      |
| Carbone attivo    | Fosfato di calcio     | Saccarosio |

- L'allumina è molto utilizzata in quanto estremamente forte come adsorbente e con un'ampia superficie attiva; inoltre esiste nelle forme: acida, neutra e basica adatte alla separazione di composti con caratteristiche di acidità e basicità differenti. Può però dare legami irreversibili con composti molto polari e catalizzare eventuali reazioni (idrolisi ed altre).

L'allumina viene preparata per disidratazione dell'idrossido di alluminio secondo la reazione:



presenta un carattere basico trattenendo così le sostanze acide.

- Il gel di silice viene preparato per azione di HCl concentrato su polisilicato di sodio in soluzione acquosa secondo la reazione:



L'acido polisilicico che si forma trattiene fortemente composti a carattere basico. I siti attivi di questa fase stazionaria sono costituiti dai gruppi silanolici:

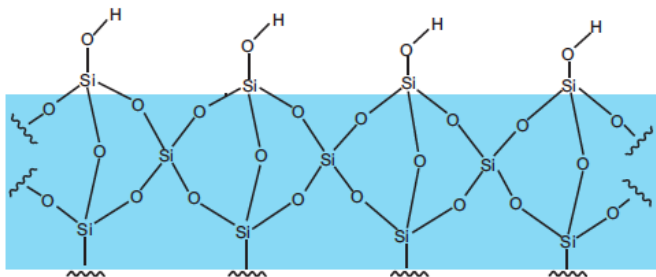
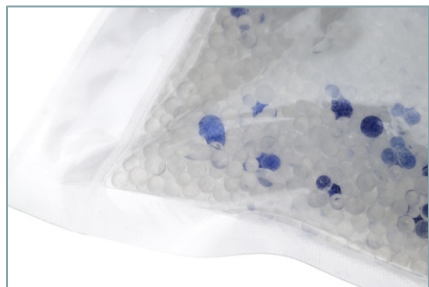


Figura 1.31 Gel di silice.

Il suo carattere acido può avere influenza sulla stabilità delle sostanze da separare e trattenere in modo irreversibile sostanze a carattere basico.

I materiali con potere adsorbente medio-debole vengono generalmente utilizzati nella separazione di sostanze naturali sensibili ad interazioni acido-base.

Un altro parametro molto importante da tener presente nella scelta della fase stazionaria è la **dimensione** dei granuli adsorbenti. Si utilizzano sia misure lineari che esprimono il diametro delle particelle in mm (es. 0.2-2 mm), sia in intervalli di *mesh* (anglosassone) che esprimono il numero di maglie per pollice lineare. E' una misura che discrimina la grandezza dei granuli in base alla capacità che hanno di attraversare le maglie di un setaccio di determinate dimensioni. Minore è il numero di mesh, maggiore è la larghezza dei pori del setaccio e maggiore è la dimensione della particelle (es. gel di silice 70-230 mesh: indica che i granuli attraverseranno un setaccio di 70 mesh, ma non uno di 230 mesh; mentre nel gel di silice 230-400 mesh, i granuli attraverseranno un setaccio di 230 mesh, ma non uno di 400 e quindi quest'ultimo avrà particelle con dimensioni minori).



La grandezza e la forma dei granuli influenza la velocità di flusso della fase mobile e quindi la risoluzione cromatografica. Maggiore è il numero di *mesh* (minore dimensione dei granuli), migliore sarà la risoluzione cromatografica in relazione ad un aumento del rapporto superficie-volume della fase stazionaria.

➤ La **fase mobile** può essere un liquido (LSC: Liquid-Solid Chromatography) o un gas (GSC: Gas-Solid Chromatography). Qualora la fase mobile sia un liquido, essa può essere formata da un solo solvente oppure da una miscela di due o più solventi in proporzione variabile. Le caratteristiche della fase mobile sono:

- bassa tossicità;
- basso *p.eb.* per esser facilmente rimossa per evaporazione;
- permettere una buona separazione dei componenti la miscela;
- non avere potere solvente nei confronti della fase stazionaria;
- non interagire (inerzia chimica) con la fase stazionaria.

Il **potere eluente** di un solvente è una funzione della costante dielettrica , della temperatura e del tipo di fase stazionaria usata. Ci sono varie classificazioni dei solventi, una molto comune è quella di Trappe :

**Tabella 1.5** Serie eluotropa di Trappe.

| SOLVENTI (Ordine crescente potere eluente) |                    |
|--|--------------------|
| Esano                                      | Acetato di etile   |
| Cicloesano                                 | Acetone            |
| Carbonio tetracloruro                      | Metiletilchetone   |
| Benzene                                    | <i>n</i> -Butanolo |
| Toluene                                    | Propanolo          |
| Diclorometano                              | Etanolo            |
| Cloroformio                                | Metanolo           |
| Etere etilico                              | Acqua              |
| Tetraidrofurano                            | Acido acetico      |

**L'eluizione della miscela** da separare può essere effettuata in due modi:

- isocratica

Si mantiene costante la composizione della fase mobile (sia singolo solvente oppure miscela di due o più solventi) per tutta la durata del processo cromatografico;

- gradiente

Si aumenta, durante la cromatografia, la polarità dell'eluente, miscelando solventi diversi. La scelta del solvente o della miscela di solventi é fatta in funzione delle caratteristiche chimico-fisiche delle sostanze da separare.

Supponendo che i componenti della miscela da separare siano sostanze polari, l'uso di una fase mobile eccessivamente polare comporta un'interazione delle molecole della fase mobile sui siti attivi dell'adsorbente, instaurando una competizione d'affinità tra molecole della fase mobile e molecole dei componenti la miscela nei confronti degli stessi siti attivi, con la conseguenza che le sostanze della miscela potrebbero interagire con un substrato adsorbente poco efficace, essendo quest'ultimo già parzialmente saturo delle molecole della fase mobile, portando ad una separazione cromatografica scadente.

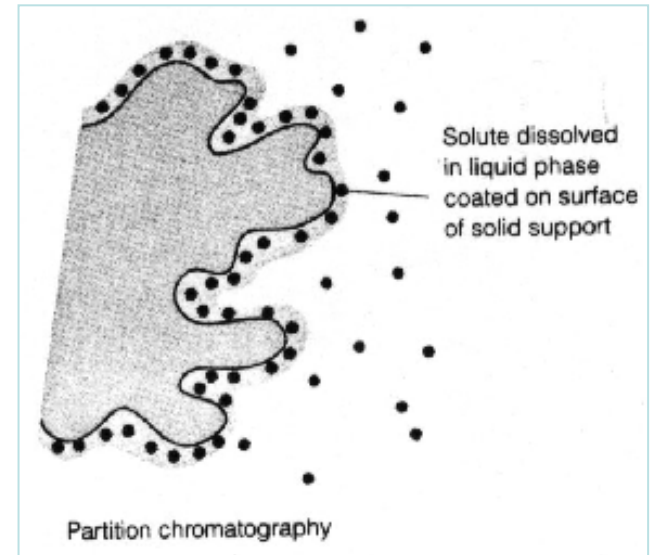
D'altra parte volendo separare una miscela polare usando una fase mobile pochissimo polare, le varie sostanze rimarrebbero preferibilmente adsorbite nella fase stazionaria, la fase mobile vi "scivolerebbe" sopra semplicemente con conseguente inefficace separazione.

**RIPARTIZIONE:** Nella cromatografia di ripartizione, la fase stazionaria è un liquido adsorbito su un supporto solido inerte a formare un film liquido e la fase mobile può essere sia un liquido immiscibile con la fase stazionaria (LLC: Liquid-Liquid- Chromatography) che un gas (GLC: Gas-Liquid-Chromatography).

### Cromatografia di Ripartizione:

- . Cromatografia gas-liquido (GLC)
- . Cromatografia liquido-liquido (LLC).

Se la fase stazionaria è un liquido, si verifica una vera e propria solubilizzazione delle sostanze nella fase stazionaria.



Si tratta di un processo in continuo che può essere assimilato ad un meccanismo di estrazione in cui le due fasi liquide si muovono in controcorrente e la fase mobile, man mano che il processo cromatografico evolve, si arricchisce di sostanza in virtù delle aggiunte di eluente fresco.

La ripartizione è regolata da una costante (a temperatura costante) data dal rapporto delle concentrazioni della sostanza nei due solventi (fasi).

$$K = \frac{C_a}{C_b}$$

**VALGONO LE STESSE  
CONSIDERAZIONI FATTE  
PER L'ESTRAZIONE CON  
SOLVENTE!!**

Ca: Concentrazione della sostanza nel solvente a.

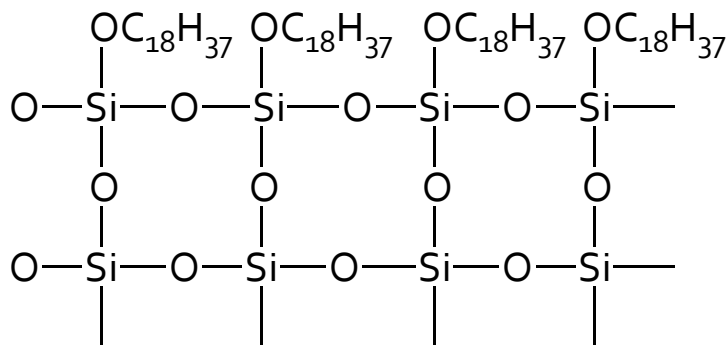
Cb: Concentrazione della sostanza nel solvente b.

Nella cromatografia di ripartizione la fase stazionaria viene classificata come:

**-fase normale** (o diretta): se il liquido supportato su solido è polare. In questo caso la fase mobile da utilizzare sarà apolare (etere etilico, cloroformio,...).

**-fase inversa:** il liquido su supporto solido è apolare (catene alifatiche come l'ottile, l'ottadecile o polimeri a natura idrofobica) e la fase mobile polare (acqua, etanolo).

I supporti solidi per la cromatografia di ripartizione liquido-liquido (LLC) non devono interagire con la sostanza da separare e i più comuni sono il gel di silice (disattivato con acqua), l'amido, la cellulosa e la terra di diatomee (con acqua). Per la fase inversa si utilizzano cellulosa o gel di silice i cui gruppi ossidrilici superficiali vengono derivatizzati con gruppi apolari (catene alifatiche o gruppi clorosilanic). In questo caso si parla di “fase legata”, che ha il vantaggio di possedere maggiore stabilità e resistenza meccanica in quanto il supporto solido forma un tutt'uno con la fase stazionaria; è comune anche per la fase normale.



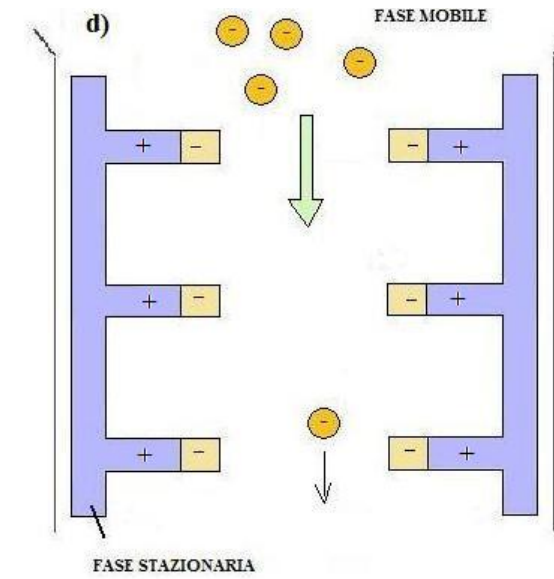
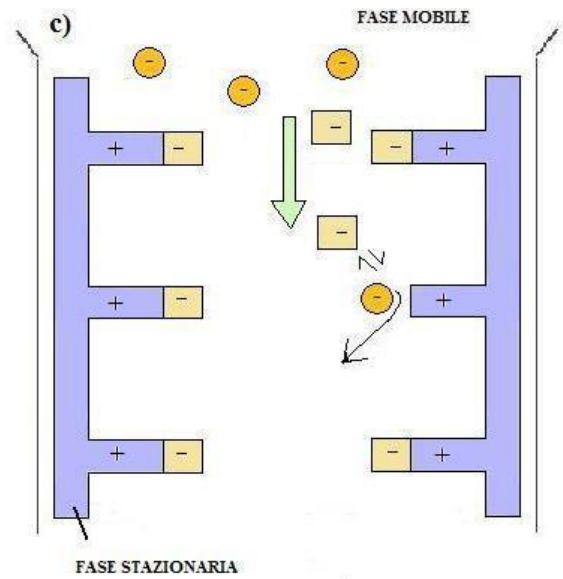
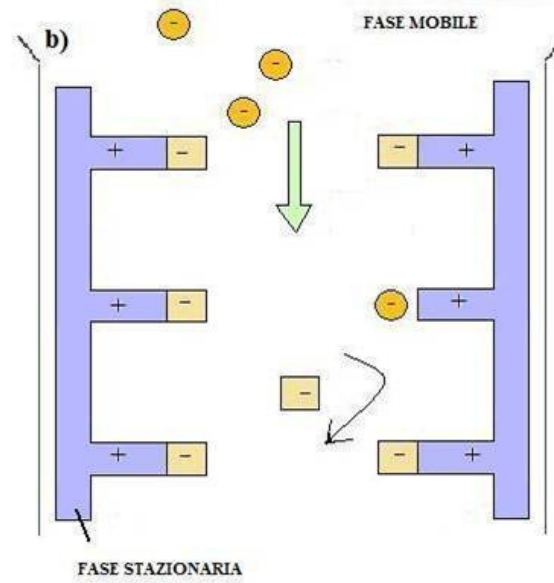
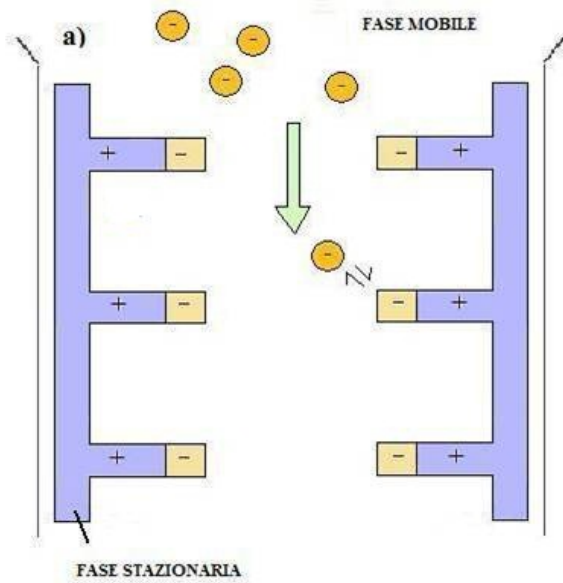
Struttura dell'octadecilsilano utilizzato in fase inversa.

## SCAMBIO IONICO:

La tecnica cromatografica a scambio ionico (IEC: Ion exchange Chromatography) prevede l'utilizzo di colonne di vetro o materiale plastico e la fase stazionaria è costituita da macromolecole con siti attivi ionizzati (una resina a scambio ionico), i cui controioni possono essere scambiati con altri, aventi carica dello stesso segno, eluiti con la fase mobile. Avviene una competizione tra i controioni della fase stazionaria e gli ioni della stessa carica contenuti nella fase mobile.

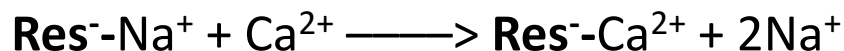
### . Cromatografia a scambio ionico (IEC).





Le resine si distinguono in scambiatori cationici o anionici in dipendenza dello ione di scambio e sono costituite da particelle sferiche di diametro variabile da 1mm a 1 mm.

Le resine a scambio ionico vengono generalmente usate per addolcire le acque dure (presenza eccessiva di sali di calcio e magnesio). Dei silicati complessi definiti "zeoliti" hanno la capacità di sostituire con ioni sodio gli ioni calcio e magnesio responsabili della durezza. La reazione di scambio può essere così schematizzata:



L'utilizzo delle resine sintetiche a base di polistirene, su cui sono fissati i gruppi scambiatori, ha permesso di allargare il campo di applicazione di questa tecnica.

|                 |   |
|-----------------|---|
| -tipo cationico | $-\text{SO}_3^{-}\text{H}^{+}$ , $-\text{SO}_3^{-}\text{Na}^{+}$                          |
| -tipo anionico  | $-\text{N}(\text{CH}_3)_4^{+}\text{OH}^{-}$ , $-\text{N}(\text{CH}_3)_4^{+}\text{Cl}^{-}$ |

Generalmente le resine cationiche scambiano lo ione  $\text{H}^{+}$  o lo ione  $\text{Na}^{+}$  (ma anche  $\text{Li}^{+}$ ,  $\text{NH}_4^{+}$ ,  $\text{K}^{+}$ , ecc.). Le resine anioniche scambiano  $\text{Cl}^{-}$  o  $\text{OH}^{-}$  (anche  $\text{F}^{-}$ ,  $\text{CH}_3\text{COO}^{-}$ ,  $\text{Br}^{-}$ , ecc.).

Nel caso delle resine di tipo cationico per ri-ottenere l'una o l'altra basta effettuare un lavaggio con una soluzione di  $\text{HCl}$  conc. o di  $\text{NaCl}$  conc., nel caso delle resine di tipo anionico basta effettuare un lavaggio con una soluzione di  $\text{NaOH}$  conc. o di  $\text{NaCl}$  conc.

Applicazioni su molecole ioniche organiche sono principalmente per separare aminoacidi, idrolizzati proteici, nucleotidi, ecc.

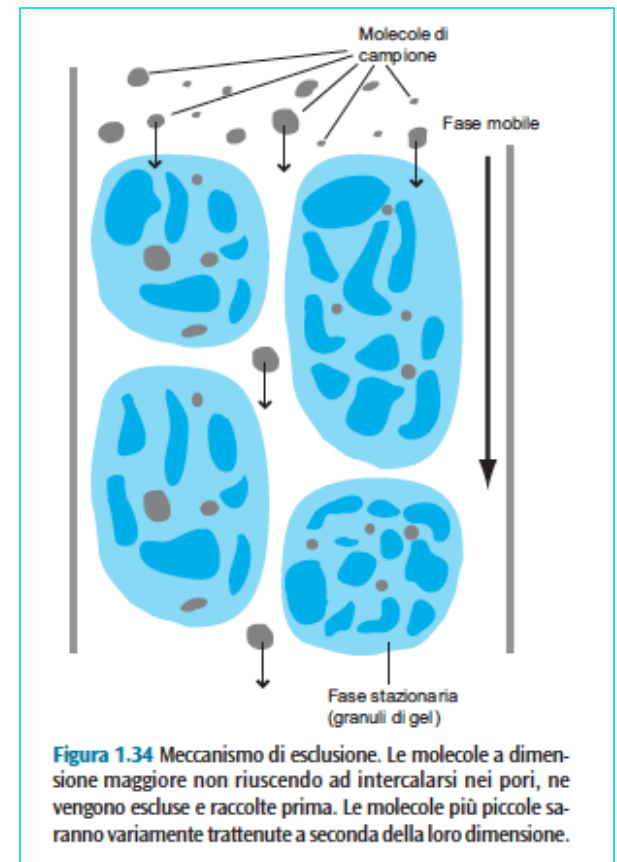
**ESCLUSIONE:** la fase stazionaria è un solido poroso o, più comunemente, un gel con pori le cui dimensioni variano secondo la composizione chimica e il modo in cui viene preparato. Le molecole dell'analita, disciolte nella fase mobile, penetrano nei pori del gel e vi rimangono per un certo tempo; le molecole troppo grandi, però, vengono escluse dai pori e perciò escono dalla colonna in tempi molto brevi.

### . Cromatografia ad esclusione (SEC).

Si parla di *cromatografia di esclusione dimensionale* (SEC) con le varianti *Gel permeazione* per la separazione di sostanze insolubili in acqua e *Gel filtrazione* per la separazione di sostanze solubili in acqua.

Nella cromatografia gel-filtrazione i polimeri più utilizzati sono polidestran (Sephadex®), poliacrilamidi e gel di agarosio.

Il grado di polimerizzazione di un gel determina la grandezza dei pori e quindi consente di orientare il suo utilizzo verso l'analita specifico che si intende separare. La tecnica è impiegata per la separazione di molecole di grandi dimensioni.

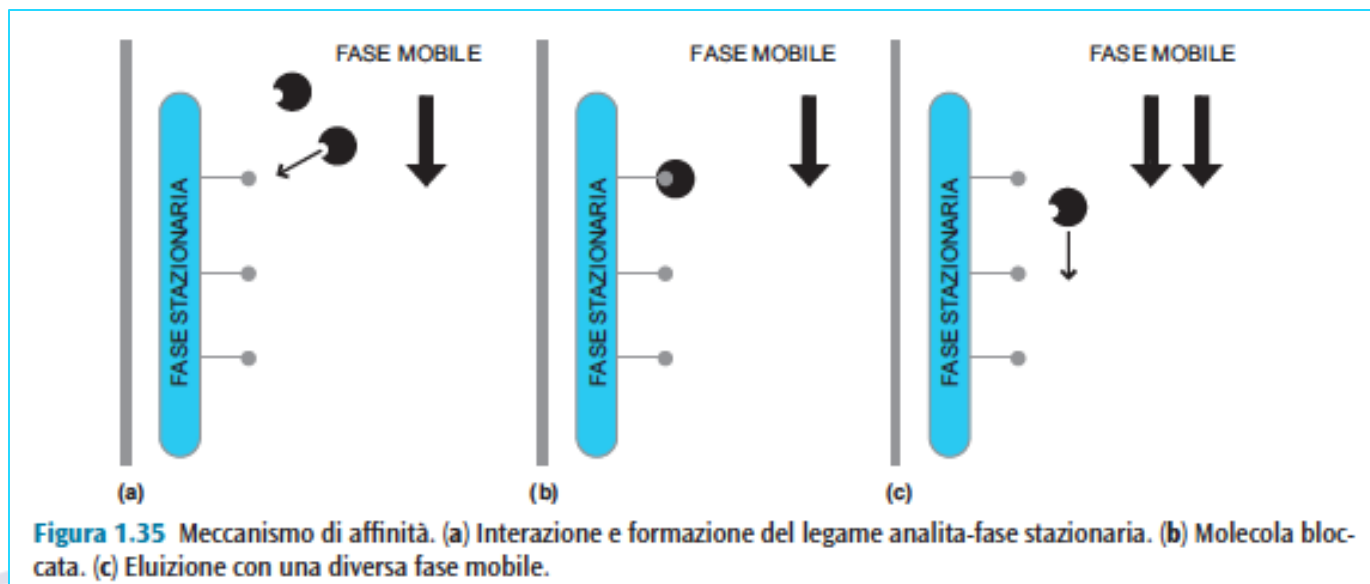


**AFFINITÀ** : La tecnica di affinità (AC: Affinity Chromatography) è una variante dell'adsorbimento che però evolve in due stadi.

Nel primo stadio vi è un'interazione di tipo biochimico (es. antigene-anticorpo), reversibile tra l'analita (es. un antigene) e la fase stazionaria (es. che presenta l'anticorpo specifico). Nel secondo stadio si opera in maniera chimica tramite un eluente "desorbente" che scinde i legami instauratisi permettendo la separazione.

Si tratta di una tecnica molto specifica (es. interazioni Ag-Ac) utilizzata prevalentemente in biochimica.

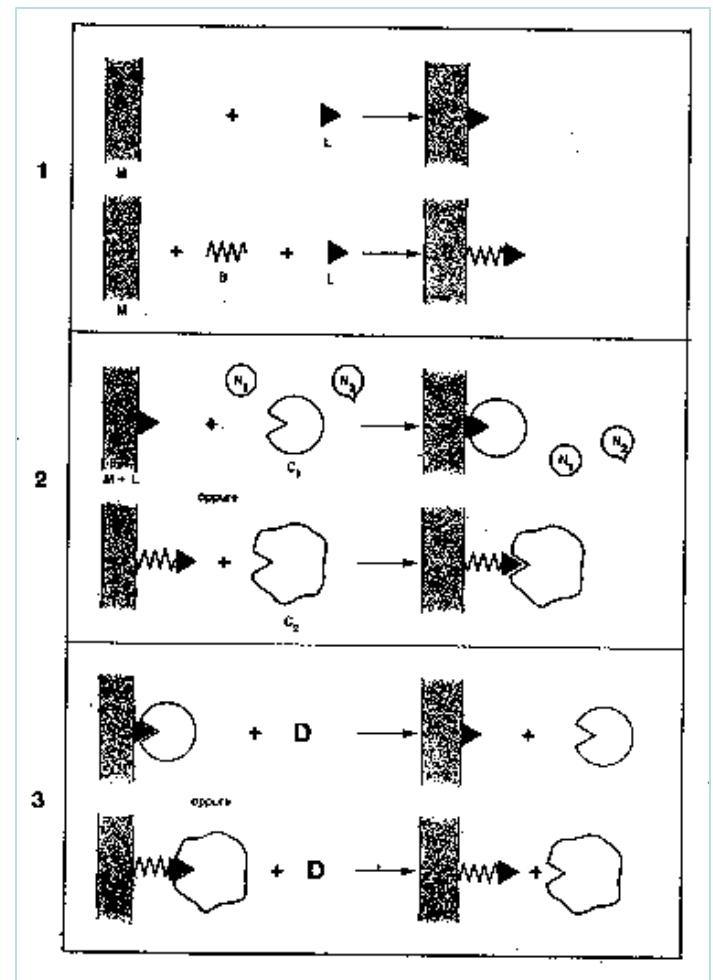
### Cromatografia di affinità (AC)



In realtà la AC sfrutta delle “matrici” , cioè dei supporti solidi di vario tipo (poliacrilammidi, agarosio, polistirene) ai quali è legato direttamente, o indirettamente con l’ausilio di “spacer”, il legante che costituisce la fase stazionaria, che può essere un anticorpo, un enzima, un farmaco, ecc..

E’ importante che il gruppo o la molecola che costituisce la fase stazionaria non venga bloccata nei siti attivi verso l’analita da cromatografare, altrimenti perderebbe la capacità risolutiva.

Inoltre, il legante, dev’essere inserito senza ricorrere a condizioni drastiche che distruggerebbero la matrice stessa.



La tecnica AC è molto utilizzata per purificare proteine leganti, cofattori, vitamine e ormoni, recettori di farmaci, ecc..Può essere effettuato su colonna o per immersione diretta del materiale da purificare (batch).

# SUDDIVISIONE DELLE PRINCIPALI TECNICHE CROMATOGRAFICHE

| FASE MOBILE | FASE STAZIONARIA |                       | MECC. DI SEPARAZIONE            | TECNICA           |
|-------------|------------------|-----------------------|---------------------------------|-------------------|
| LIQUIDA     | SU STRATO        | SOLIDO                | ADSORBIMENTO<br>SCAMBIO IONICO  | TLC<br>TLIEC      |
|             |                  | GEL                   | ESCLUSIONE                      | TLG               |
|             |                  | LIQUIDO               | RIPARTIZIONE                    | TLC-RP<br>PC      |
|             | IN COLONNA       | SOLIDO                | ADSORBIMENTO                    | LSC               |
|             |                  | LIQUIDO               | RIPARTIZIONE                    | LLC               |
|             |                  | SOLIDO+LIQUIDO legati | ADSORBIMENTO e<br>RIPARTIZIONE  | BPC<br>ISC<br>IPC |
|             |                  | SOLIDO o GEL          | SCAMBIO IONICO                  | IEC<br>IC         |
|             | IN COLONNA       | GEL                   | ESCLUSIONE                      | GPC<br>GFC        |
|             |                  |                       | AFFINITÀ                        | AC                |
|             | IN COLONNA       | SOLIDO                | ADSORBIMENTO<br>(ed ESCLUSIONE) | GSC               |
|             |                  | LIQUIDO               | RIPARTIZIONE                    | GLC               |

**TLC:** Thin Layer Chromatography  
**TLIEC:** Thin Layer Ion Exchange Chromatography  
**TLG:** Thin Layer Gel Chromatography  
**TLC-RP:** Thin Layer Chromatography-Reverse Phase  
**PC:** Paper Chromatography  
**LLC:** Liquid-Liquid Chromatography  
**BPC:** Bonded Phases Chromatography  
**ISC:** Ion Suppression Chromatography

**IPC:** Ion Pair Chromatography  
**IEC:** Ion Exchange Chromatography  
**IC:** Ionic Chromatography  
**GPC:** Gel Permeation Chromatogr.  
**AC:** Affinity Chromatography  
**GSC:** Gas Solid Chromatography  
**GLC:** Gas Liquid Chromatography

# CROMATOGRAFIA SU STRATO SOTTILE: TLC (Thin Layer Chromatography)

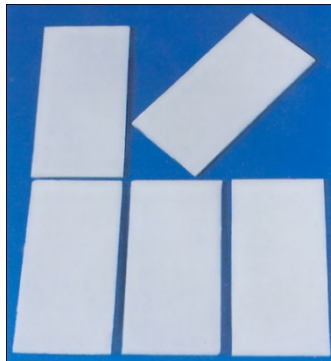
La cromatografia su strato sottile, o meglio TLC, è una tecnica microanalitica perlopiù qualitativa molto utilizzata in chimica. Si tratta di una cromatografia di adsorbimento o ripartizione dove la fase stazionaria è immobilizzata ad un supporto inerte come vetro o alluminio (anche plastica, ma poco utilizzato) formando un sistema chiamato “lastrina”. Le lastre hanno dimensioni opportune (20x20 cm o 5x10 cm) e presentano uno strato di fase stazionaria di spessore di 0.2-0.4 mm.



## FASI STAZIONARIE E FASI MOBILI:

✓ Le fasi stazionarie solide più utilizzate sono il gel di silice e l'allumina (adsorbenti forti), e in questo caso si parla di cromatografia di adsorbimento con una fase mobile apolare; ovvero si parla di cromatografia a fase diretta; ci sono anche il kieselguhr o terra di diatomee e la cellulosa (adsorbenti medio-deboli) oltre a molti altri più specifici per determinati analiti o gruppi funzionali (poliammidi, fosfati, amido, ecc...).

Se lo strato è trattato con sostanze liquide apolari e si utilizzano fasi mobili polari, allora il principio è quello della ripartizione e la tecnica è a fase inversa.

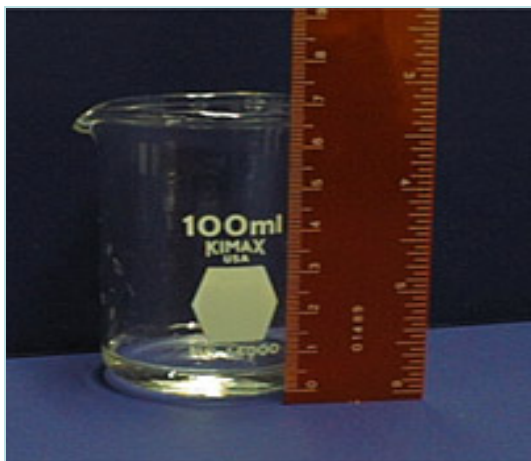


✓ Le fasi mobili sono quelle già viste in precedenza (serie eluotropa).

## Tecnica operativa

Oggigiorno le lastrine sono già pronte all'uso e fornite da varie ditte produttrici, ma molti anni fa venivano preparate con l'ausilio di "stratificatori" che servivano ad applicare la fase stazionaria sul supporto sottoforma di pasta fluida omogenea che successivamente veniva essiccata in stufa e poi raffreddate.

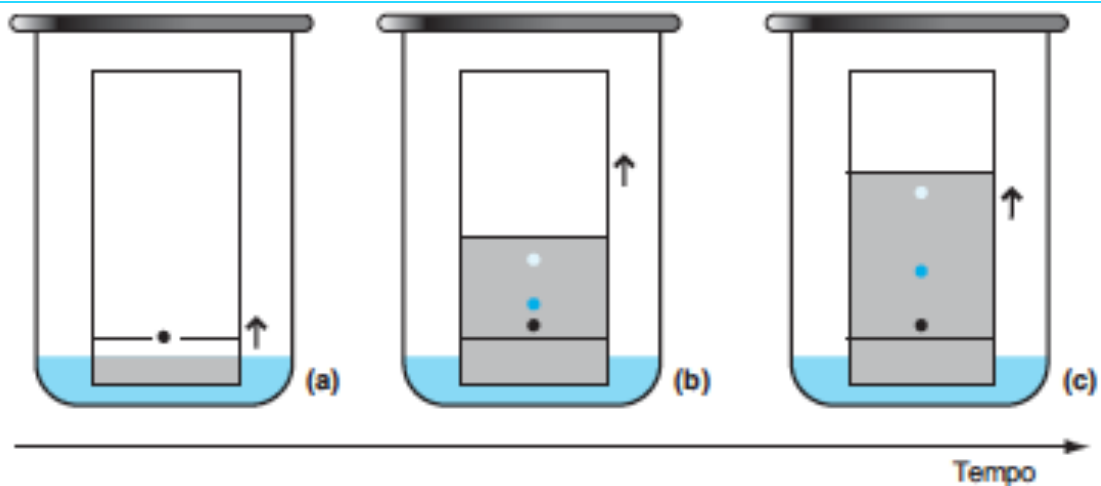
Si opera con l'ausilio di un contenitore di vetro chiuso (camera di eluizione) nel quale è contenuto l'eluente, in atmosfera satura, collocato sul fondo a raggiungere un livello di 0.5-1 cm.



La lastrina viene trattata “seminando” una goccia di campione (opportunamente sciolto in una piccola quantità di solvente), con l’ausilio di un capillare di vetro, a circa 1.5-2 cm dal bordo inferiore della lastra. Particolare attenzione bisogna fare sia per quanto riguarda la macchia dell’analita, che non deve essere troppo grande o sproporzionata (a volte è utile asciugare le macchie con un phon), sia per la deposizione della lastrina nella camera di eluizione, che deve avvenire con cautela evitando che l’eluente bagni immediatamente la goccia seminata. Normalmente per effettuare una corretta semina delle macchie da cromatografare, si opera tracciando una riga leggera di matita a 1.5-2 cm dal bordo inferiore (comunque sopra il livello dell’eluente).



Una volta introdotta la lastrina nella camera di eluizione si attende lo sviluppo ascendente dell'eluente, che trascinerà le macchie verso l'alto e le separerà. Esiste anche la tecnica di sviluppo discendente e quella a sviluppo orizzontale, ma sono molto poco utilizzate. La tecnica è terminata quando il fronte dell'eluente raggiunge circa 1 cm il bordo superiore della lastra.



**Figura 1.36** Cromatografia su strato sottile (TLC). Camera di eluizione con lastra cromatografica. L'eluizione delle macchie avviene per sviluppo ascendente.

Successivamente si passa alla rivelazione del campione, che può avvenire o utilizzando reattivi chimici o tramite luce ultravioletta.

- ***Rivelazione con reattivi chimici:***

Si opera nebulizzando uno specifico reattivo direttamente sulla lastrina asciutta. Si usano nebulizzatori in vetro adatti oppure si opera per immersione e successivo riscaldamento della lastra.

A seconda della molecola da rivelare si utilizzerà un determinato reagente. I più comuni sono:

- Vapori di iodio: adatto per composti contenenti doppi legami;
- Permanganato di potassio: per composti facilmente ossidabili;
- Ninidrina: per aminoacidi, amine e amino zuccheri;
- Alizarina: adatto per cationi;
- Rodamina B: per lipidi
- $\text{H}_2\text{SO}_4$  in etanolo (25-50%): opera per carbonizzazione (macchie Marroni)

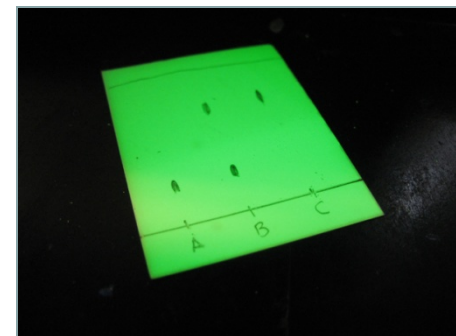
E molti altri adatti per particolari sostanze.



- ***Rivelazione con lampada UV:***

A volte i composti chimici contengono gruppi cromofori derivanti da gruppi funzionali come doppi legami coniugati, carbonili, ecc...in questo caso è sufficiente illuminare la lastrina con una lampada che emetta a 254 nm e 365 nm; si noteranno delle macchie luminose su fondo scuro.

Se invece l'analita non possiede gruppi cromofori, ci sarà la necessità di trattare la lastrina con una sostanza che risulti fluorescente ai raggi UV; illuminando la lastra con apposita lampada si noterà una macchia scura su sfondo fluorescente. Attualmente le lastre da TLC sono pretrattate con una sostanza fluorescente che permette la rivelazione alla lampada UV a 254 nm.



## Analisi qualitativa

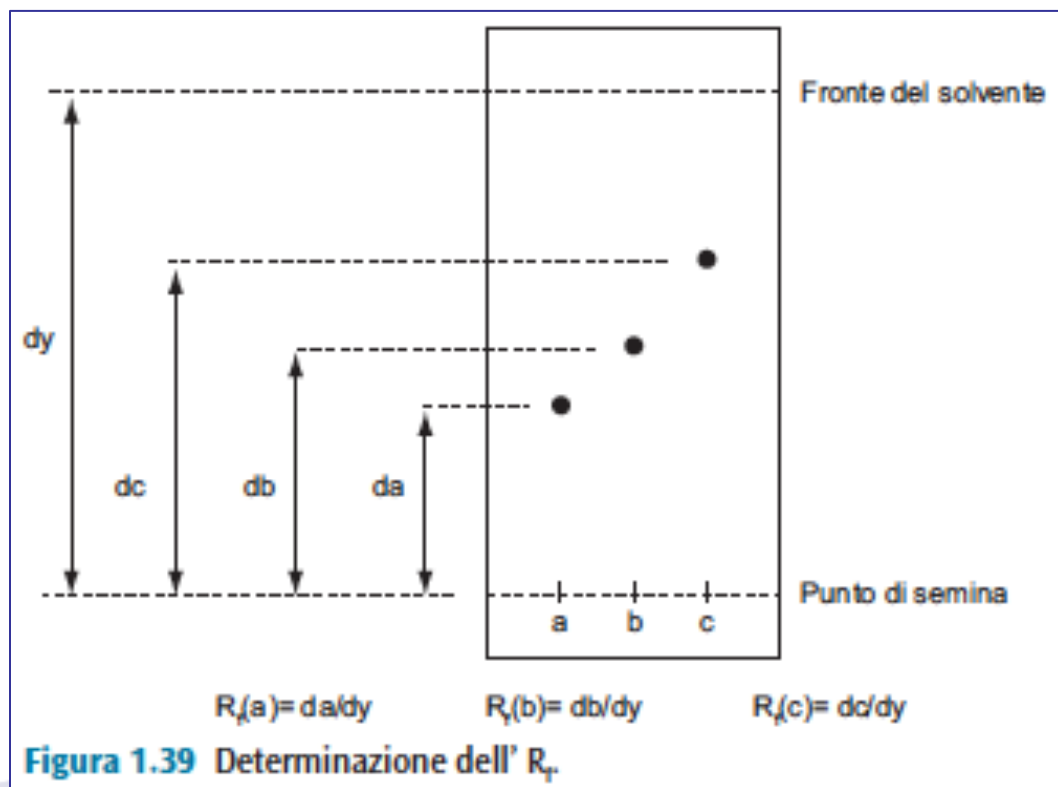
La cromatografia su strato sottile è perlopiù una tecnica qualitativa dove si opera per confronto diretto tra le macchie dell'analita e quelle di "riferimento". E' una tecnica molto utilizzata in sintesi chimica in quanto serve per monitorare l'andamento di una reazione. In tal senso si possono depositare le miscele all'inizio della reazione, quelle dopo un determinato tempo e quelle a reazione ultimata; magari affiancando gli standard dei reagenti iniziali e quello del prodotto finale (se già noto).

Il parametro più utilizzato per caratterizzare un composto tramite la TLC è il **fattore di ritenzione (o di ritardo):  $R_f$**  che corrisponde al rapporto tra la corsa del campione ( $d_x$ ) e la corsa dell'eluente ( $d_y$ ).

$$R_f = \frac{d_x}{d_y}$$

Se si tratta di più analiti, per ciascuno si avrà il proprio  $R_f$ :

L' $R_f$  è una grandezza caratteristica di ciascun composto e dipende sia dalle condizioni operative che dalle caratteristiche della fase stazionaria e dell'eluente. Il suo valore è compreso tra 0 (ferma al punto di semina) e 1 (migra con il solvente). Inoltre bisogna ricordare che sostanze diverse, in determinate condizioni sperimentali, possono avere lo stesso  $R_f$ ; in questi casi è utile eseguire più TLC con differente fase mobile e/o stazionaria.



## ***Altri parametri caratteristici della TLC***

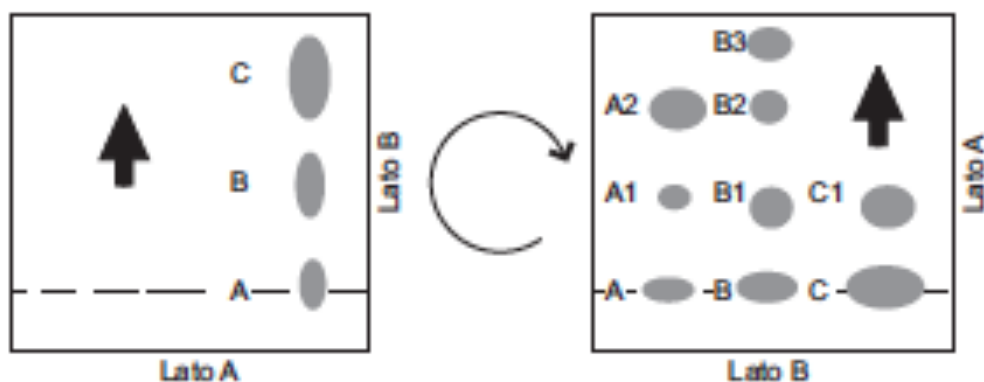
Come già detto sopra per la cromatografia di adsorbimento, la capacità, l'efficienza, la selettività e quindi la risoluzione totale, sono dei parametri peculiari per definire una tecnica cromatografica. Di conseguenza più le macchie risultano simmetriche (buona capacità), compatte (buona efficienza) e ben distinte (buona selettività), più il sistema cromatografico della TLC è **ben risolto**.

Eventualmente si può estrarre la macchia dallo strato, asportando con una spatola la porzione di materia su cui si è diffusa la macchia e dissolvendo quest'ultima in un solvente opportuno; si filtra e la sulla soluzione si possono condurre analisi chimico-fisiche (analisi elementare, UV, IR, NMR, Massa, ecc...). Le determinazioni quantitative risultano però difficili in quanto la procedura risulta difficilmente riproducibile e standardizzabile.

*La TLC è una tecnica analitica di identificazione di alcune sostanze riportate nella Farmacopea Ufficiale Italiana (es. fenotiazine, sulfamidici).*

## TLC bidimensionale

A volte può risultare necessario operare un'ulteriore separazione con un secondo eluente (o miscela di eluenti) in cui gli analiti hanno diversa costante di partizione ( $K$ ). In questo caso la procedura prevede una seconda eluizione con la lastrina posizionata in posizione perpendicolare rispetto alla prima corsa.



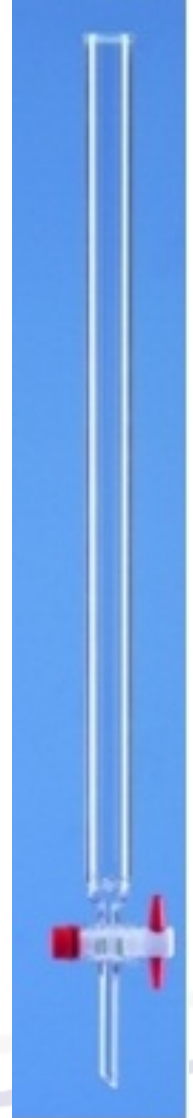
**Figura 1.38** Cromatografia su strato sottile (TLC) bidimensionale.

La TLC bidimensionale sono utili nelle analisi di aminoacidi nei liquidi biologici e di idrolizzati totali o parziali di proteine, in quanto si ottengono delle “mappe” cromatografiche caratteristiche.

# CROMATOGRAFIA SU COLONNA CLASSICA : CC

La cromatografia su colonna è la tecnica cromatografica più utilizzata in laboratorio per la separazione di miscele omogenee.

I meccanismi più comuni che coinvolgono una cromatografia su colonna sono l'adsorbimento (LSC: Liquid-Solid Chromatography), la ripartizione (LLC: Liquid-Liquid Chromatography) e lo scambio ionico (IEC: Ion Exchange Chromatography). Questi meccanismi ed i materiali utilizzati come fasi stazionarie e mobili, sono già stati trattati in precedenza.

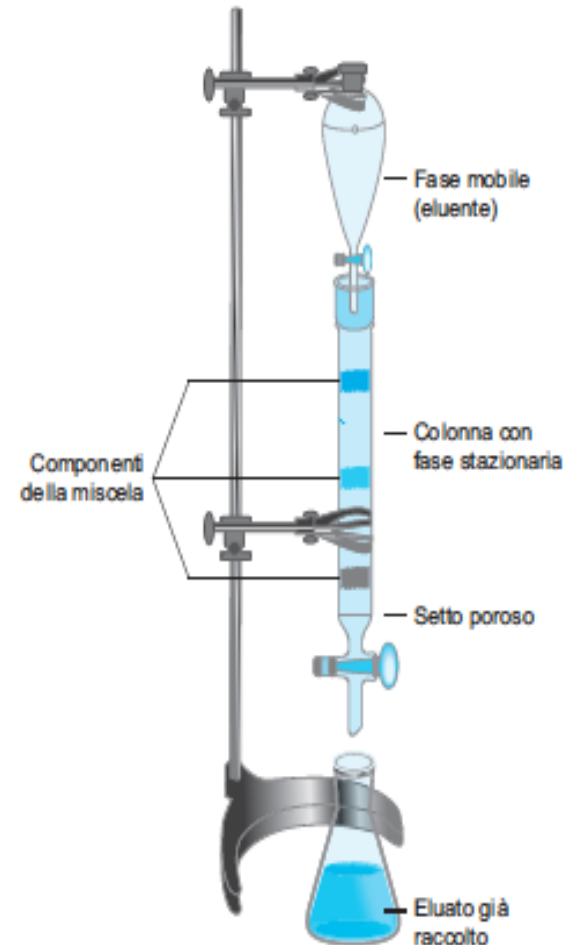


## Tecnica operativa

Si utilizzano dei sostegni che tramite pinze fissano la colonna ed il relativo imbuto gocciolatore in posizione verticale.

Le colonne sono di vetro (talvolta di materiale plastico monouso) e vengono così impaccate con la fase stazionaria opportuna. L'impaccamento di una colonna viene effettuato in due modi: "a secco", versando nella colonna dapprima l'adsorbente e quindi l'eluente; oppure "a umido" versando una sospensione adsorbente-eluyente preparata in precedenza. In entrambi i due casi è necessario far sedimentare e compattare in modo uniforme il materiale solido in modo da evitare la formazione di crepe o bolle che potrebbero sfalsare la buona riuscita della procedura cromatografica.

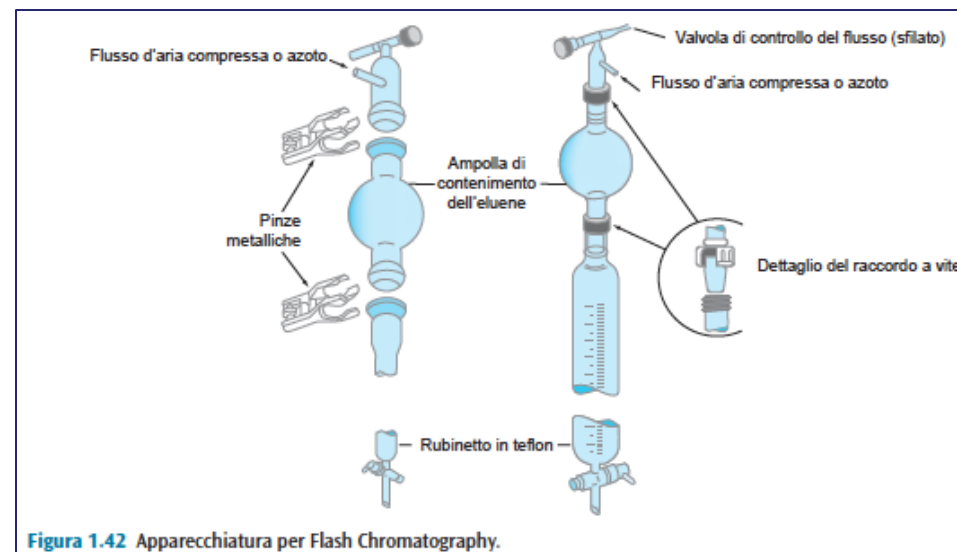
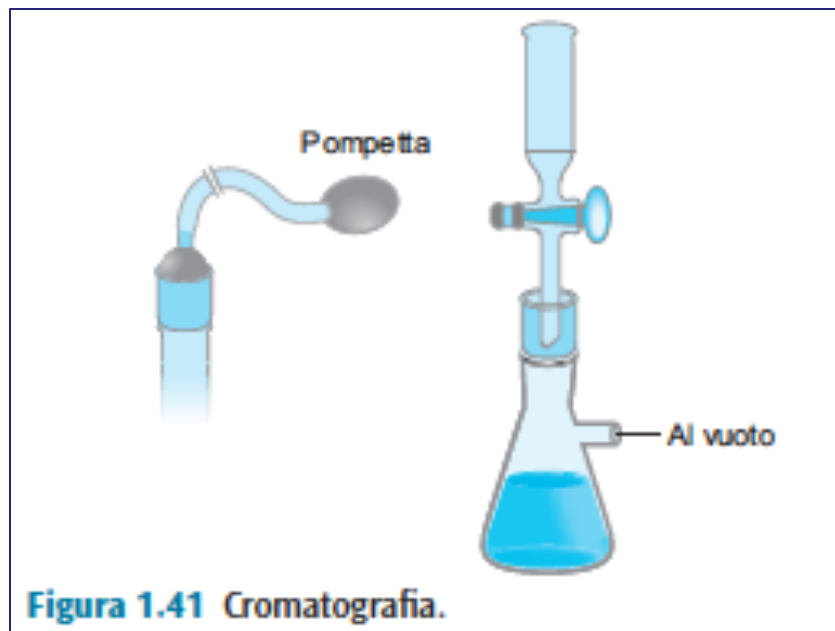
La miscela da separare viene introdotta in testa alla colonna e poi fatta eluire con la fase mobile adatta (in isocratica o in gradiente); il processo continua fino a raccolta di tutte le frazioni che compongono la miscela iniziale.



**Figura 1.40** Cromatografia su colonna classica: L'eluizione avviene nella parte superiore per mezzo di un imbuto gocciolatore contenente la fase mobile che per gravità scenderà nella colonna contenente la miscela da separare in testa. Il processo prosegue fino a raccolta di tutte le frazioni che compongono la miscela.

Le colonne cromatografiche sono in genere di vetro, con o senza rubinetto e dotate di un setto poroso che evita il passaggio della fase stazionaria nel contenitore di raccolta. Normalmente le colonne sono lunghe dai 20 ai 100 cm con diametro che varia da 0.5 ai 5 cm.

Spesso si può “forzare” l’eluizione e ridurre così i tempi di lavoro operando con l’ausilio di una pompetta manuale (a palloncino) raccordata alla testa della colonna, oppure creando una depressione all’uscita mediante pompa da vuoto.

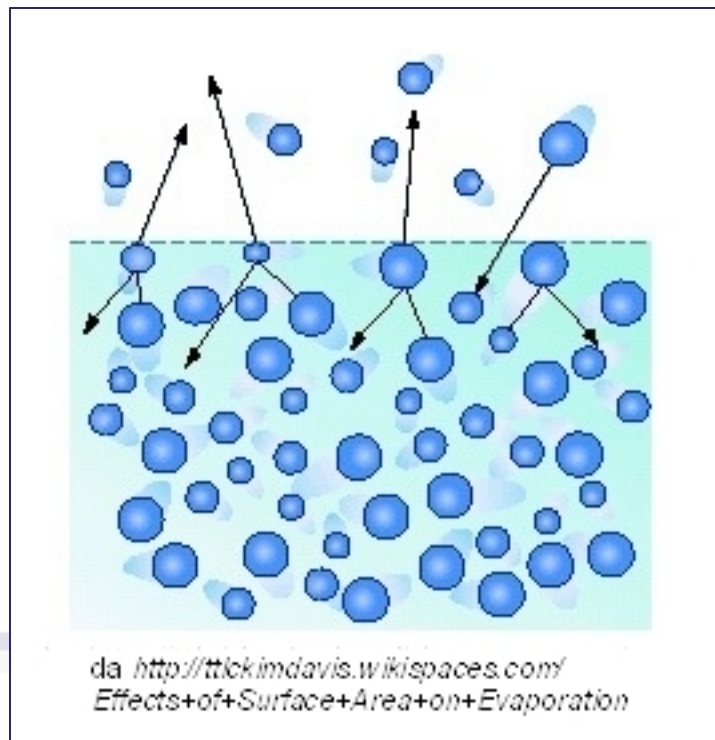


## F. EVAPORAZIONE

E' il passaggio di stato dalla fase liquida a quella aeriforme.

Anche questa transizione di fase, come le precedenti, dipende dalle condizioni di pressione e temperatura e rappresenta la prima parte del processo di distillazione visto in precedenza.

A livello pratico è conveniente lavorare inducendo evaporazione a pressioni minori di quella atmosferica, in modo di abbassare così la  $T^\circ$  di ebollizione del liquido.



Quando il recupero di una sostanza contenuta in una soluzione è possibile previo allontanamento del solvente, si procede all'evaporazione del solvente stesso, riscaldando su piastra calda, su bagno-maria, o su bagno ad olio a secondo della temperatura a cui è opportuno lavorare. Ci sono in commercio evaporatori (rotanti) che riducono i tempi di lavoro in quanto lavorano sotto vuoto.



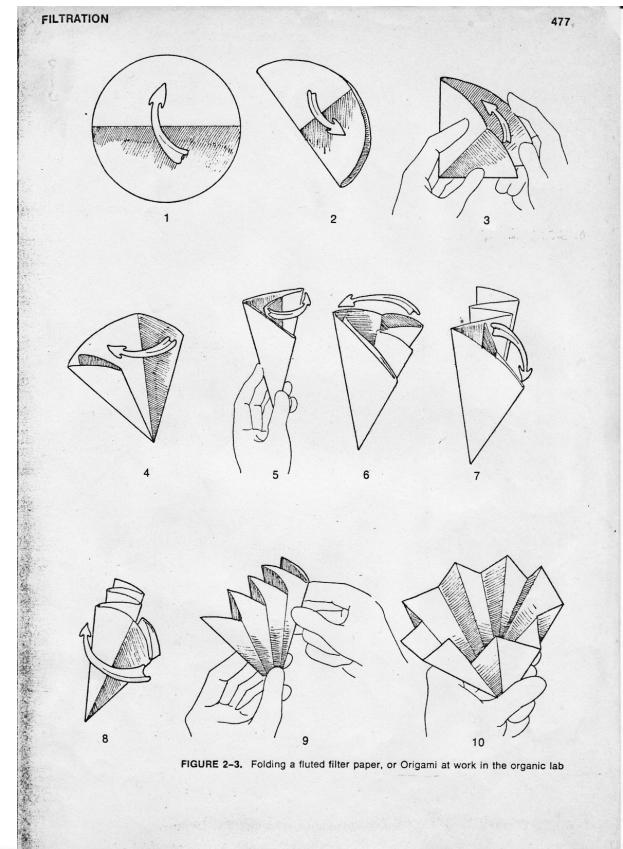
Il principio di funzionamento è comunque quello di un distillatore, in quanto i vapori che si liberano vengono condensati (da un condensatore) e recuperati o eliminati.

## G. FILTRAZIONE

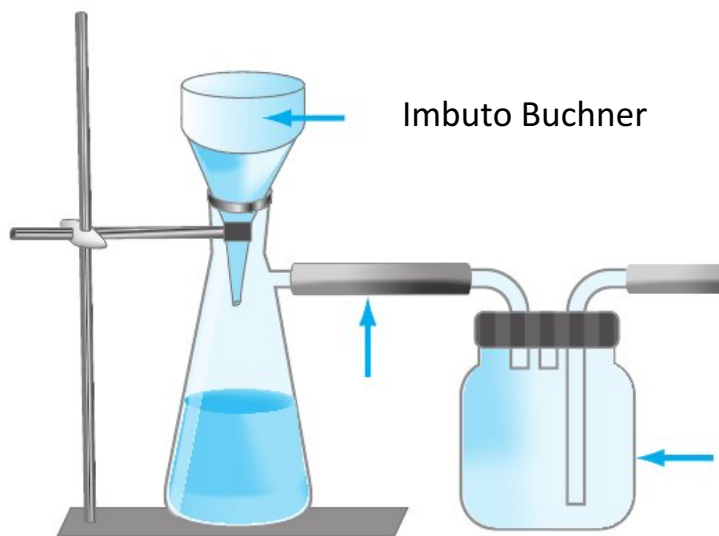
La filtrazione serve per allontanare una sostanza insolubile da un mezzo liquido disperdente quando occorra procedere al recupero della fase solida o di quella liquida o di entrambe.

Le tecniche di filtrazione si suddividono in:

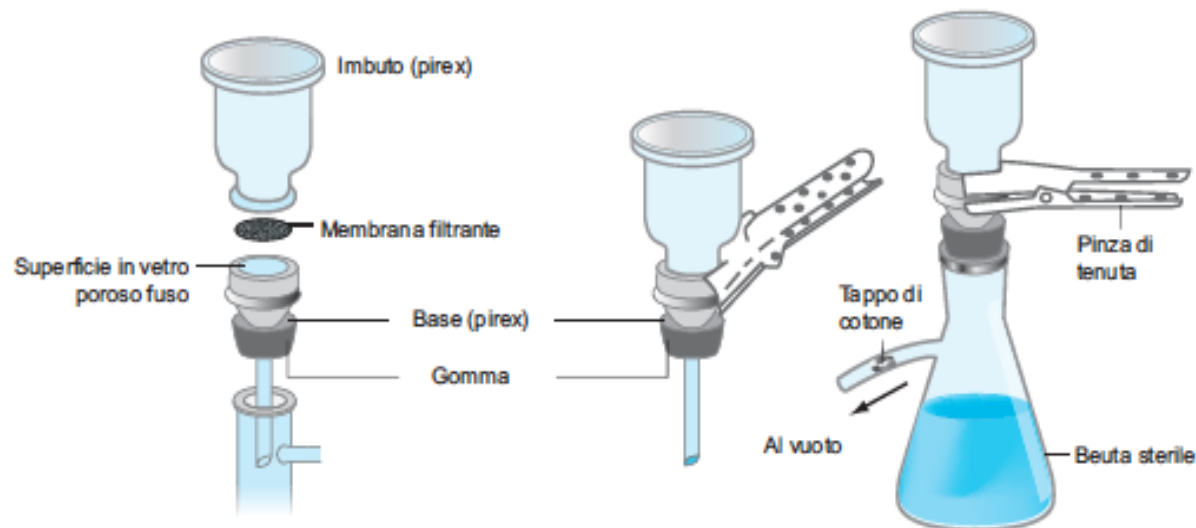
- a) Filtrazione per carta da filtro;
  - b) filtrazione sotto vuoto, con filtro di Buchner;
  - c) Filtrazione selettiva per membrane filtranti;
- La filtrazione per carta da filtro viene eseguita comunemente con filtro a pieghe o a cono.



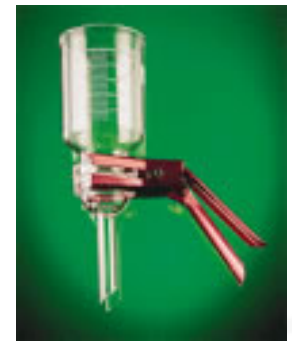
-La filtrazione sotto vuoto viene eseguita con imbuto di porcellana (o vetro) con base forellata sulla quale si applica un disco di carta da filtro ritagliato su misura. L'imbuto viene montato a tenuta (anello di gomma) sulla beuta codata che viene tenuta ferma da una pinza e collegata ad un sistema da vuoto.



-La filtrazione selettiva su membrane filtranti viene attuata o sotto vuoto o esercitando una pressione sopra al filtro costituito da membrane di materiale plastico a porosità variabile. E' molto usata in campo microbiologico (virus, funghi e batteri) e immunologico (complessi Ag-Ac).



**Figura 1.47** Filtrazione selettiva su membrane filtranti. Questa tecnica è molto simile alla precedente, ma consente un'elevata filtrazione ed è utile per separare particelle molto piccole o per purificare solventi utili per tecniche più sensibili.



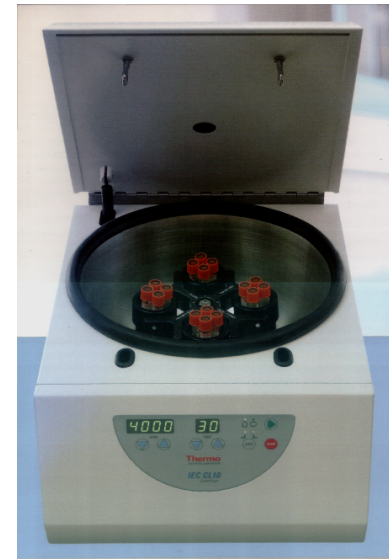
## H. CENTRIFUGAZIONE

Le tecniche di separazione per centrifugazione si basano sul comportamento delle particelle quando vengono sottoposte ad un campo centrifugo.

Particelle in soluzione, se lasciate in condizioni di quiete, tenderanno a sedimentare per effetto della gravità e per ogni particella, la velocità di sedimentazione sarà proporzionale alla forza applicata. La centrifugazione si basa proprio su questo principio per cui aumentando la forza applicata alle particelle, esse sedimenteranno più velocemente. Strumentalmente si tratta di un rotore dove alloggeranno le provette, o altri portacampioni, posizionato centralmente sull'albero motore della centrifuga. Le particelle di forma, densità o dimensioni diverse, sedimenteranno a velocità diverse e quindi potranno essere separate.

La **velocità di sedimentazione** dipenderà non solo dal campo centrifugo applicato, ma anche da fattori come:

- massa della particella;*
- densità e viscosità del mezzo di sedimentazione;*
- forma della particella (quanto si discosta dalla forma sferica).*



## Il campo centrifugo

$$F_c = m \omega^2 r$$

dove  $\omega$  (in rad/sec) =  $(2\pi/60) \text{ rpm}$

$$F_c = m (4 \pi^2 / 3600) (\text{rpm})^2 r$$

Esprimendo rispetto alla forza di gravità terrestre:

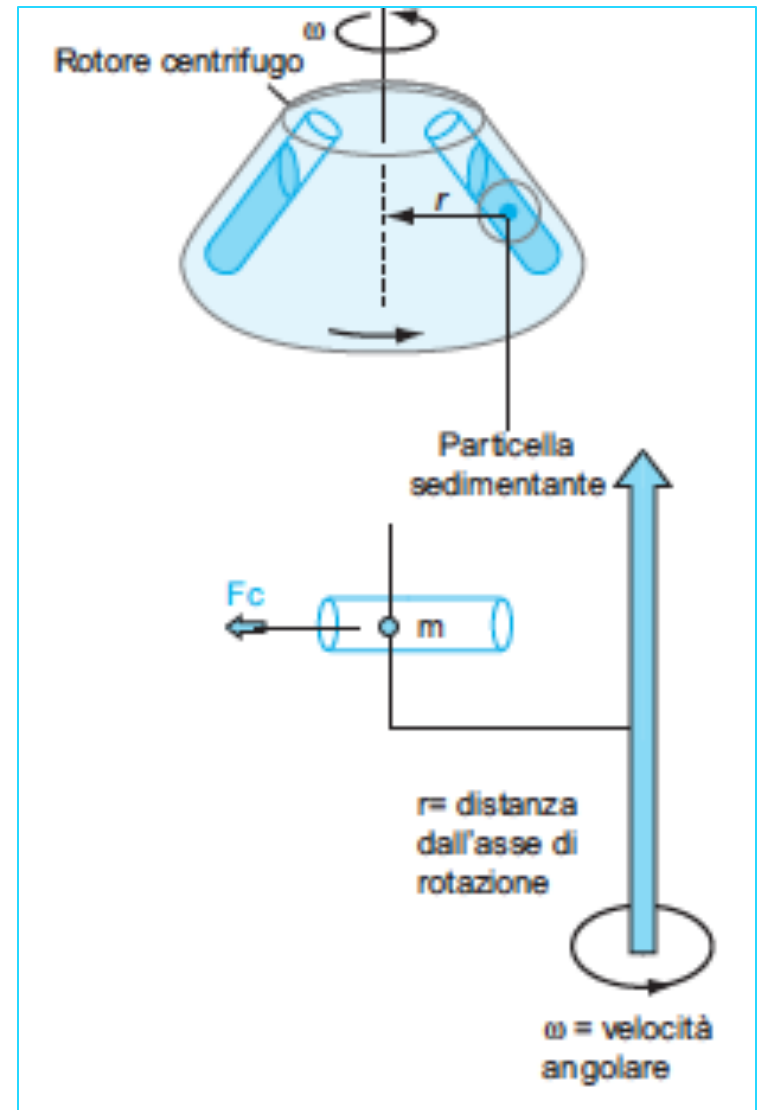
$$F_g = mg$$

$$\text{RCF} = F_c / F_g = m \omega^2 r / mg = (4 \pi^2 / 3600) (\text{rpm})^2 r / g$$

( $g = 981 \text{ cm/s}^2$ ):

$$F_c / F_g = \text{RCF} = 1.12 \times 10^{-5} \times (\text{rpm})^2 \times r$$

**RCF = Relative Centrifugal Force**



## Classificazione centrifughe

❑ Le centrifughe sono solitamente classificate in base **alla capacità di carico** in microcentrifughe, centrifughe di bassa, media e alta capacità. Orientativamente, il volume massimo di carico va dai 40 ml delle microcentrifughe, fino ai 6 litri delle centrifughe ad alta capacità.

❑ Un altro criterio convenzionale di classificazione si basa **sulla forza centrifuga generata** (**RCF: Relative Centrifugal Force** e viene indicata con un numero che rappresenta un multiplo della forza di gravità terrestre "x g"), cioè sulla velocità, secondo la quale le centrifughe sono suddivise in centrifughe a bassa, media, alta velocità ed ultracentrifughe. Il rapporto esistente tra la RCF, le rotazioni per minuto (rpm) sviluppate dalla macchina ed il raggio del rotore (r), è descritto dalla seguente equazione (vista prima):

$$RCF = (1.12 \cdot 10^{-5}) \cdot r \cdot (rpm)^2$$

rpm= rotazioni per minuto

r= raggio del rotore —————> Dipenderà dalla casa costruttrice

Le centrifughe possono essere **classificate** in quattro categorie:

1. **Piccole centrifughe da banco** (microcentrifughe da pochi ml e centrifughe fino 500 ml con velocità di 4000-6000 rpm).
2. **Centrifughe refrigerate a grande capacità** (camera refrigerata e velocità fino a 6000 rpm ma di capacità fino a 6L totale).
3. **Centrifughe refrigerate a grande velocità** (camera refrigerata e velocità fino a 25000 rpm ma di capacità fino a 1,5 L totale).
4. **Ultracentrifughe preparative** (80000 rpm) **o analitiche** (70000 rpm).

Oppure:

