

# SEPARAZIONE CON TECNICHE CROMATOGRAFICHE

ver 02.11.19

## Cromatografia (1906, Tswett)



Insieme di varie tecniche che servono per

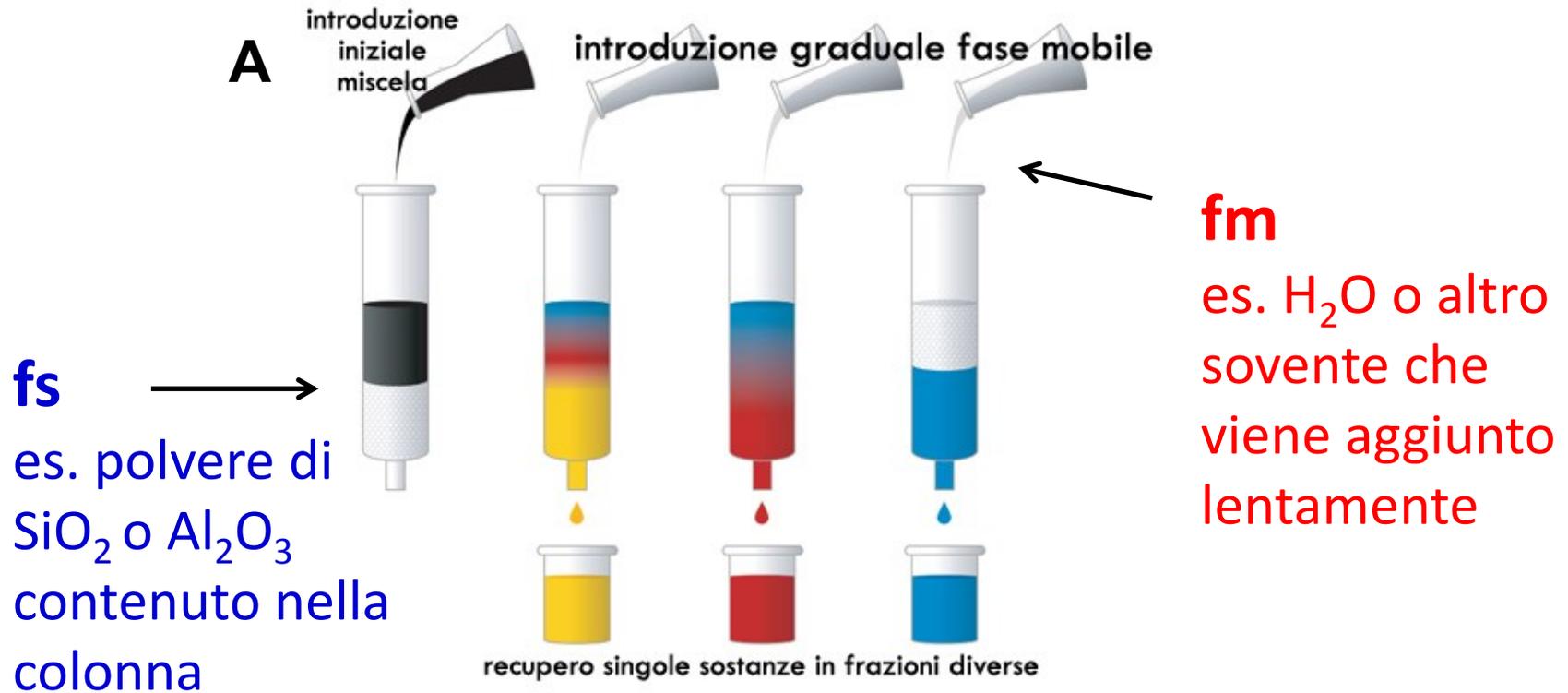
- 1) separare i componenti di una soluzione
- 2) determinare quanti soluti sono presenti in una soluzione
- 3) riconoscere i componenti di una soluzione
- 4) determinare la concentrazione di ciascun componente

## Come funziona:

la soluzione che contiene i soluti da separare viene messa a contatto contemporaneamente con  
una fase mobile (fm) detta eluente  
una fase stazionaria (fs)

tra loro in equilibrio.

# es. per chiarire: **cromatografia in fase liquida su colonna**



La **miscela liquida iniziale A**, contenente i vari soluti, viene introdotta in una colonna contenente la **fs**. Si aggiunge lentamente la **fm** liquida: i soluti scendono a velocità diversa e si separano perché hanno diversa affinità con la **fs** e la **fm**: la **fs** trattiene i componenti, la **fm** li spinge avanti

Quando la soluzione e le due fasi sono messe a contatto, si verifica un trasferimento continuo dei soluti tra le due fasi cioè si osserva migrazione dei soluti quando sono nella **fm** mentre stanno fermi quando si trovano legati alla **fs**.

La separazione avviene grazie alla diversa affinità dei composti in soluzione per le due fasi.

**I vari soluti devono essere solubili nella **fm**.**

## Perché la **fs** trattiene selettivamente le molecole?

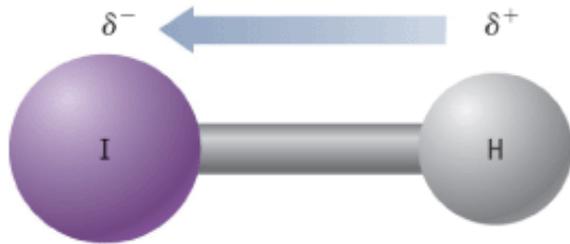
La **fs** di solito è costituita da polvere di granulometria molto fine di  $\text{Al}_2\text{O}_3$  oppure  $\text{SiO}_2$  opportunamente pre-trattati che possono interagire con le molecole di soluto in maniera elettrostatica:

la separazione è quindi funzione della polarità delle molecole.

Sulla superficie della **fs** solida si generano dei "siti attivi" che possono trattenere in modo differenziato i soluti in fase gassosa o liquida grazie alla formazione di legami deboli del tipo di van der Waals, dipolo-dipolo o ponte a H.

# Cos'è la polarità

## MOLECOLE POLARI E NON POLARI



**FIGURA 8.9** Il legame covalente polare in HI. Lo iodio attrae maggiormente gli elettroni di legame rispetto all'idrogeno. Il risultato è la presenza di una parziale carica negativa ( $\delta^-$ ) sullo iodio e una parziale carica positiva ( $\delta^+$ ) sull'idrogeno.

La molecola è polare quando il baricentro delle cariche + e - non coincide

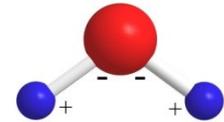
la polarità dipende dalla struttura molecolare e dalla differenza di elettronegatività dei costituenti



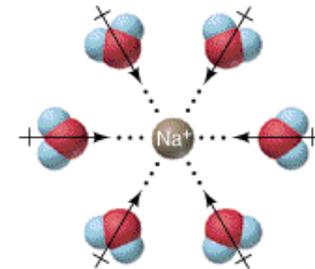
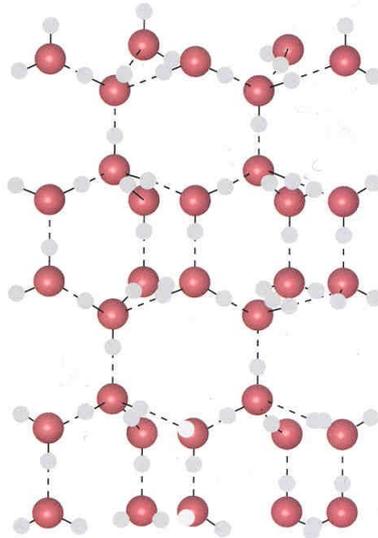
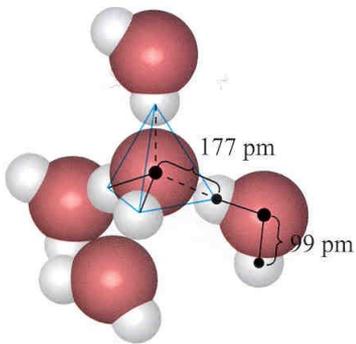
Kotz, Treichel, Townsend  
**Chimica**  
Edises

**es.  $\text{H}_2\text{O}$  è una molecola polare:**

a causa dell'elevata elettronegatività di O rispetto a H le cariche non sono distribuite omogeneamente nella molecola. Eccesso di carica - su O e di carica + su H  
 $\text{H}_2\text{O}$  è un dipolo.

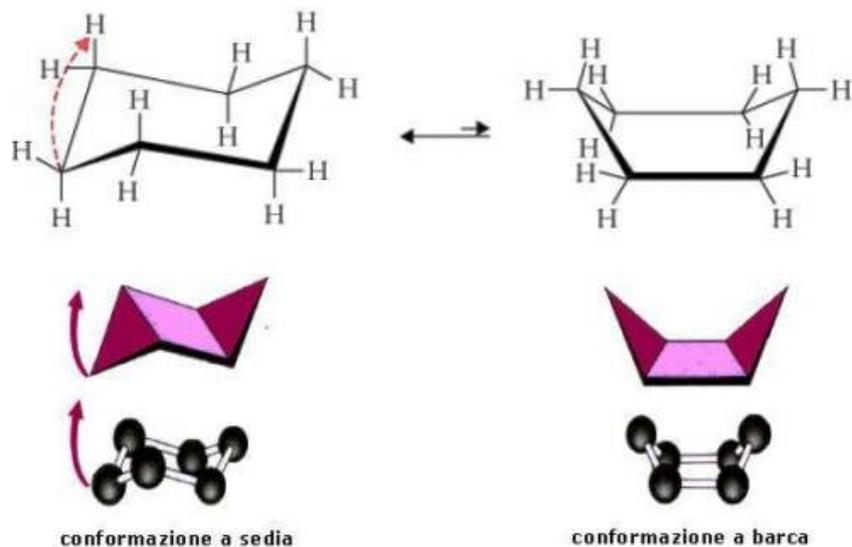


$\text{H}_2\text{O}$  forma legame  
ponte a H molto forte



Ion-dipole

$\text{H}_2\text{O}$  si coordina attorno  
agli ioni con legame forte



Il cicloesano è una molecola non polare

Non scioglie i sali ma scioglie parecchi composti organici

Se non esiste la **fm** (il solvente eluente) con la giusta polarità o che non scioglie i soluti, si fanno miscele di vari solventi che devono essere miscibili tra di loro.

Se due solventi non sono miscibili tra loro, si cerca un terzo solvente in cui siano solubili entrambi.

## Altro tipo di cromatografia in fase liquida

### **CROMATOGRAFIA DI SCAMBIO IONICO**

Il principio di funzionamento è sempre il medesimo

Molto utile se si vogliono separare specie cariche in soluzione

**fs** una resina solida che trattiene selettivamente le specie cariche (non più  $\text{SiO}_2$  o  $\text{Al}_2\text{O}_3$ )

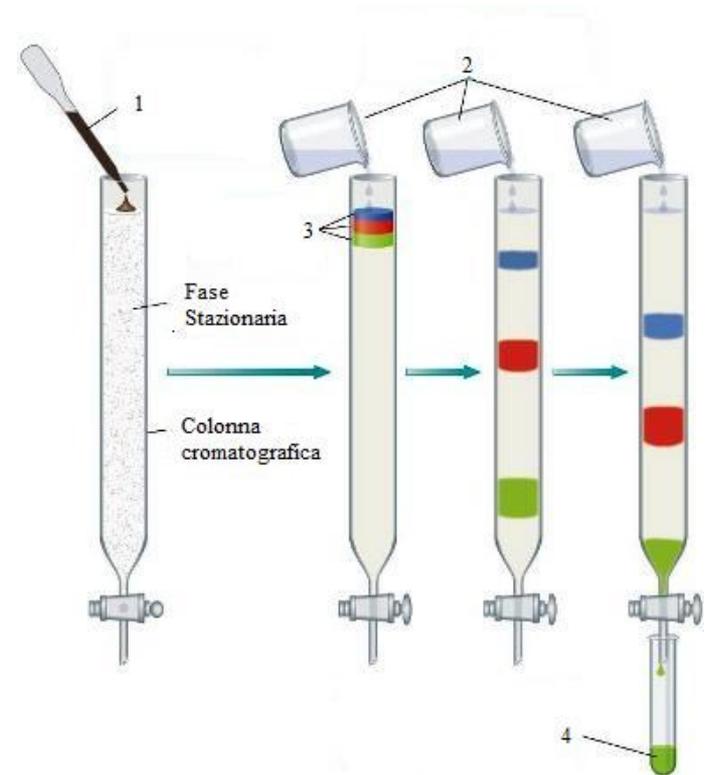
**fm** un solvente liquido

E' fondamentale scegliere per entrambi la giusta polarità

Ioni di natura diversa vengono trattenuti o eluiti in modo diverso.

Quindi si muovono nella colonna a diversa velocità

La tecnica è molto usata per la separazione di miscele di specie biologiche cariche in soluzione.



La cromatografia **su colonna** permette in genere di ottenere quantità relativamente grandi di sostanze purificate, mg o g.

Quindi è una **tecnica preparativa**.

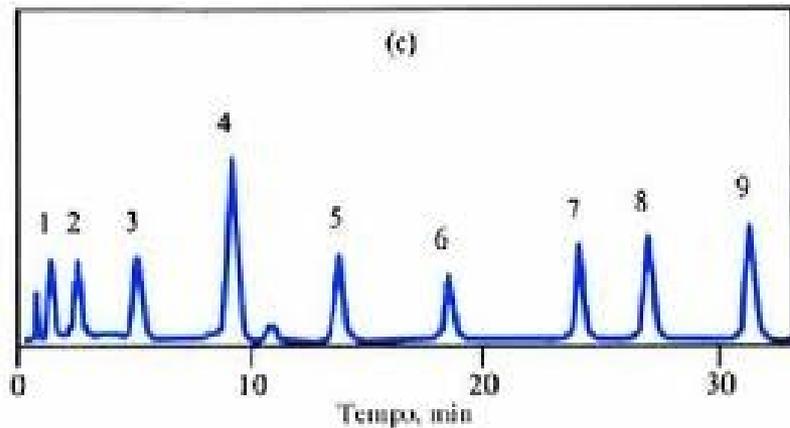
Se le sostanze separate sono **colorate**, allora si può osservare chiaramente la loro uscita separata.

Se non sono colorate, allora la loro uscita viene evidenziata facendo passare la soluzione in un sistema rivelatore, ad es. una cella da spettrofotometro (U.V; I.R.).

# CROMATOGRAMMA

grafico in cui sono riportate le concentrazioni delle varie specie separate, in funzione del tempo da quando la cromatografia è iniziata.

Ogni picco rappresenta l'uscita di un componente dalla colonna: la concentrazione della specie è proporzionale all'area del suo picco.



Esistono dei rilevatori ottici o di altra natura che misurano l'uscita delle varie specie.

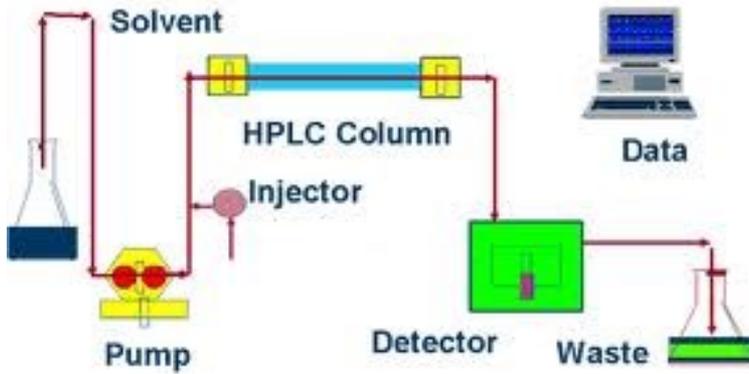
# High performance liquid chromatography (HPLC)

È una tecnica cromatografica analitica di uso molto frequente per la sua praticità, compattezza della strumentazione, tempi brevi di separazione ed elevatissima efficienza.

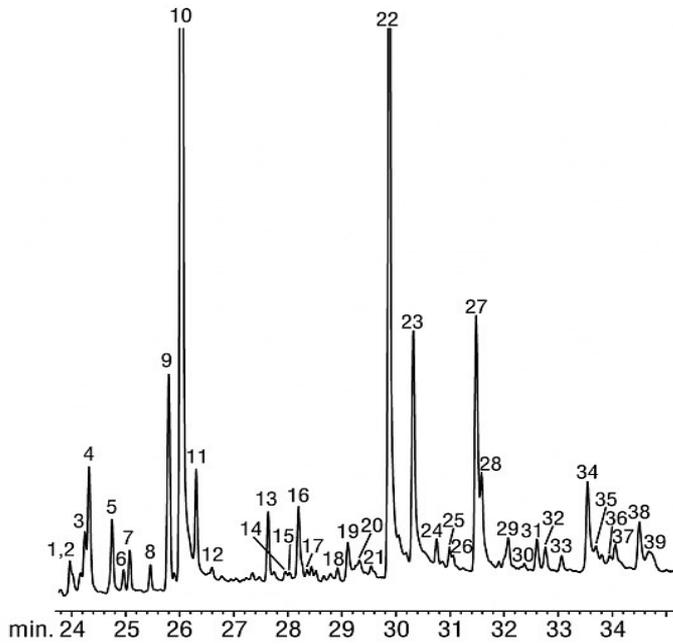
**E' utilizzata per a.a., proteine, composti naturali,...**

**Si usa soprattutto quando i componenti da separare si decompongono ad alta temperatura per cui non è possibile adoperare la gascromatografia.**

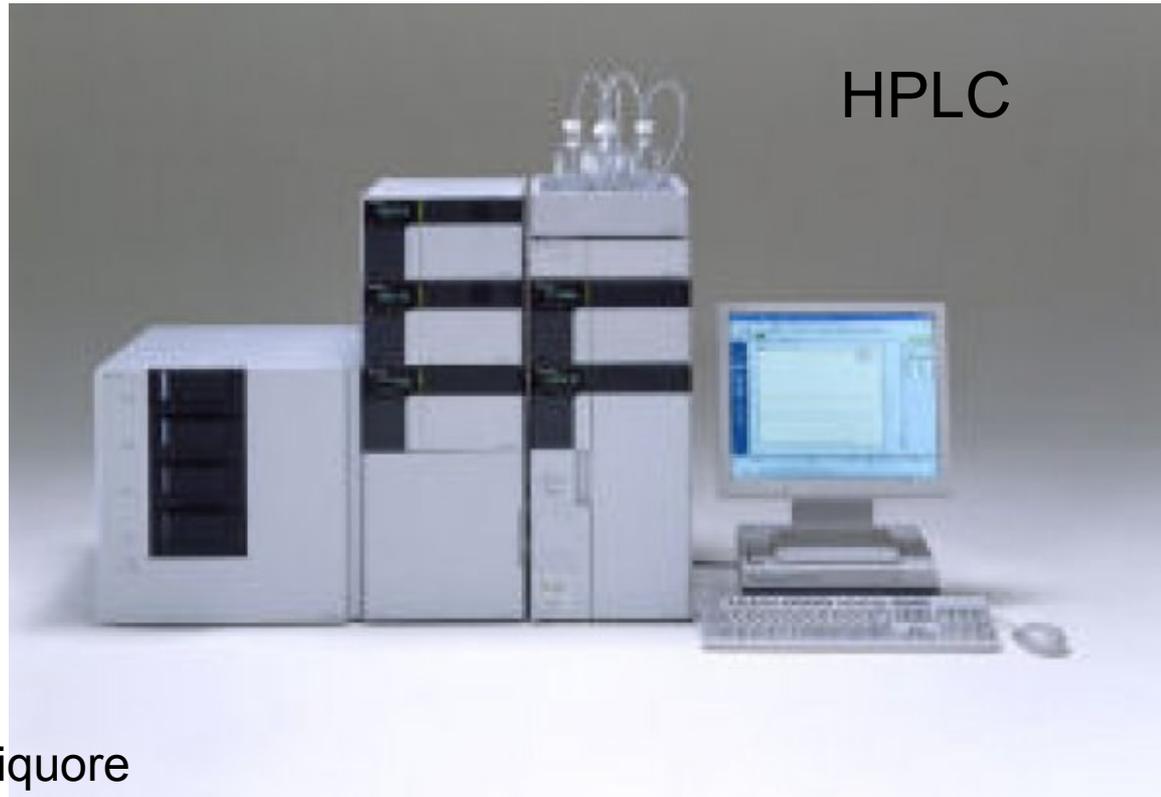
## HPLC System

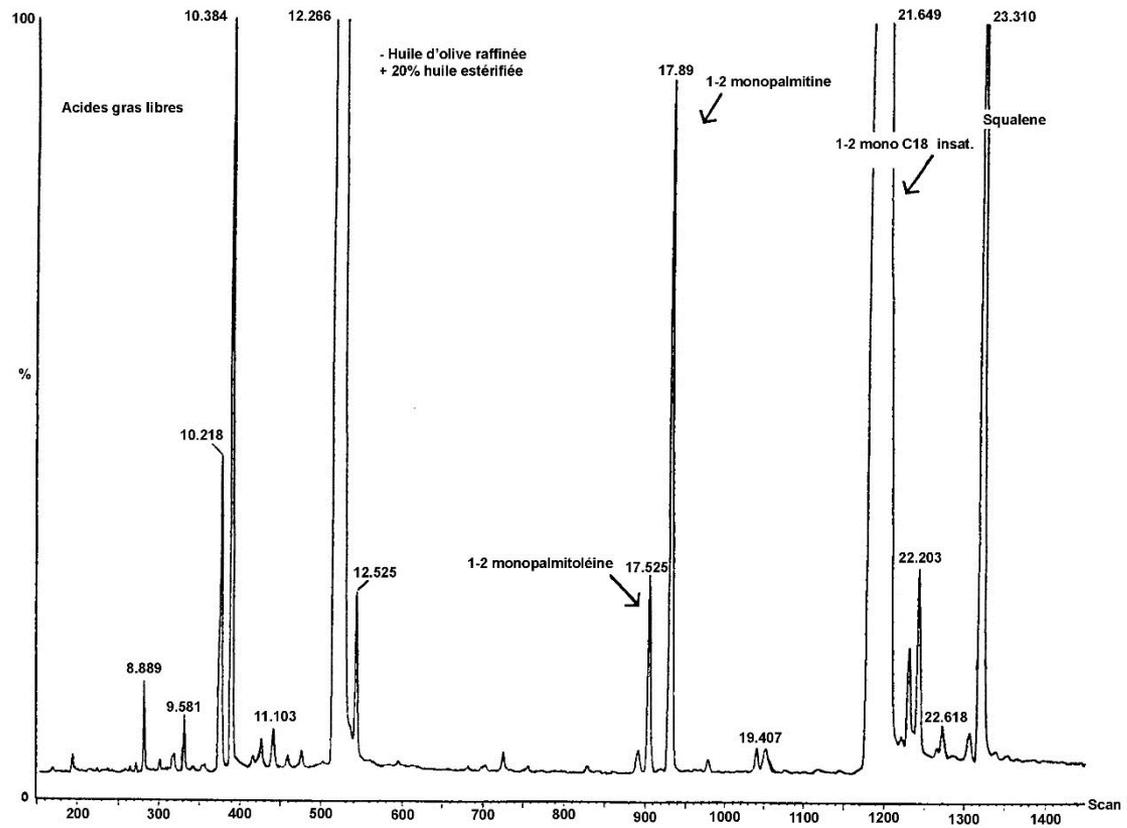


## Colonne x HPLC



cromatogramma HPLC di un liquore



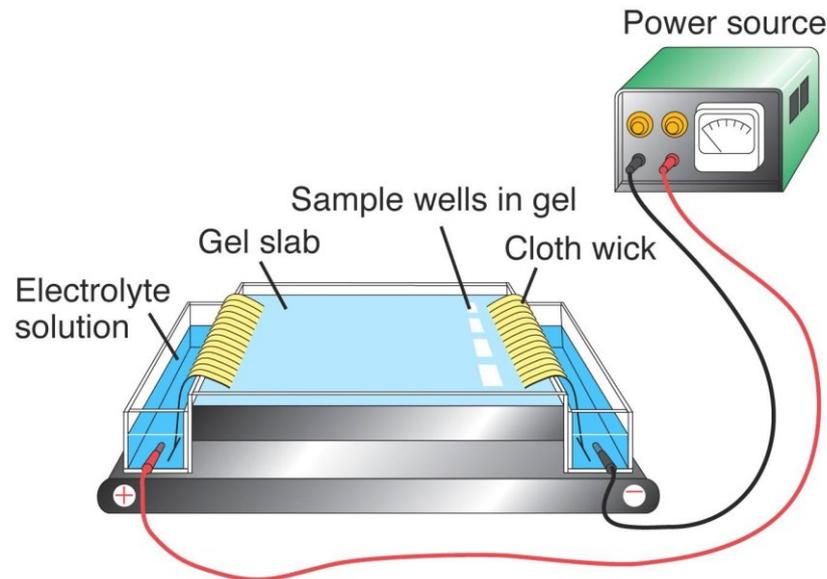


Cromatogramma HPLC di un olio d'oliva raffinato

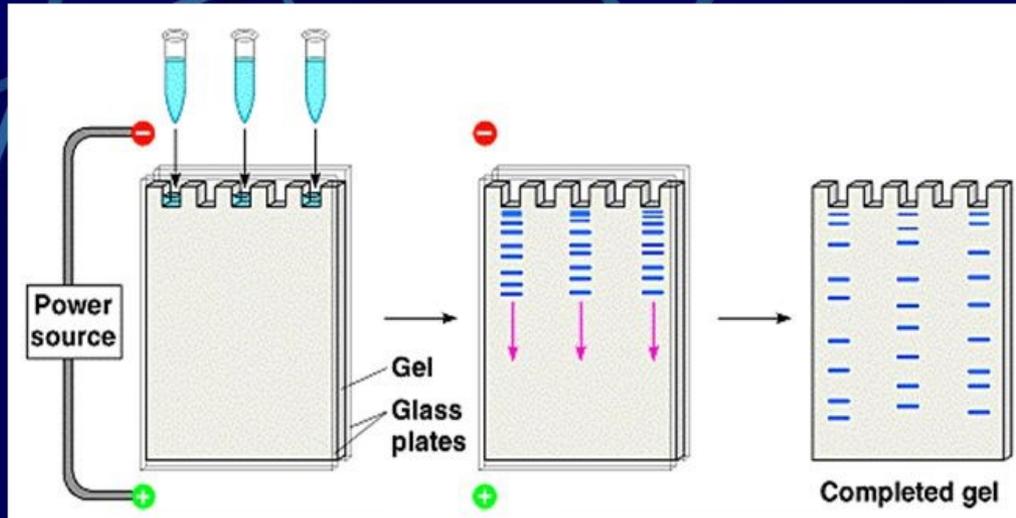
# ELETTROFORESI

Tecnica che combina la **cromatografia** con l'azione di un **campo elettrico sugli ioni** presenti in una soluzione:

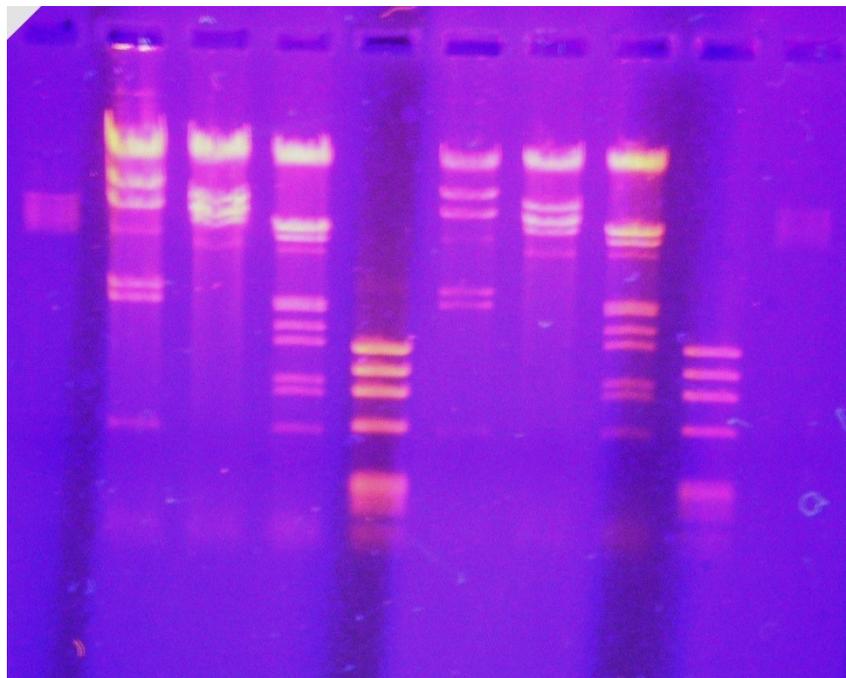
molto usata per separazione e riconoscimento di sostanze cariche di interesse biologico ed in particolare i frammenti di DNA, proteine e per gli a.a.



# Elettroforesi di DNA



- I gel sono fatti di agarosio o di poliacrilammide
- I campioni di DNA vengono caricati ed e' applicata una differenza di potenziale
- Il DNA, carico negativamente, migra verso l'elettrodo "+"
- I frammenti di DNA piu' piccoli migrano piu' velocemente



elettroforesi di dna

# **GASCROMATOGRAFIA** (fase mobile è un gas)

Adoperata per sostanze che non si decompongono a caldo e che possono vaporizzare.

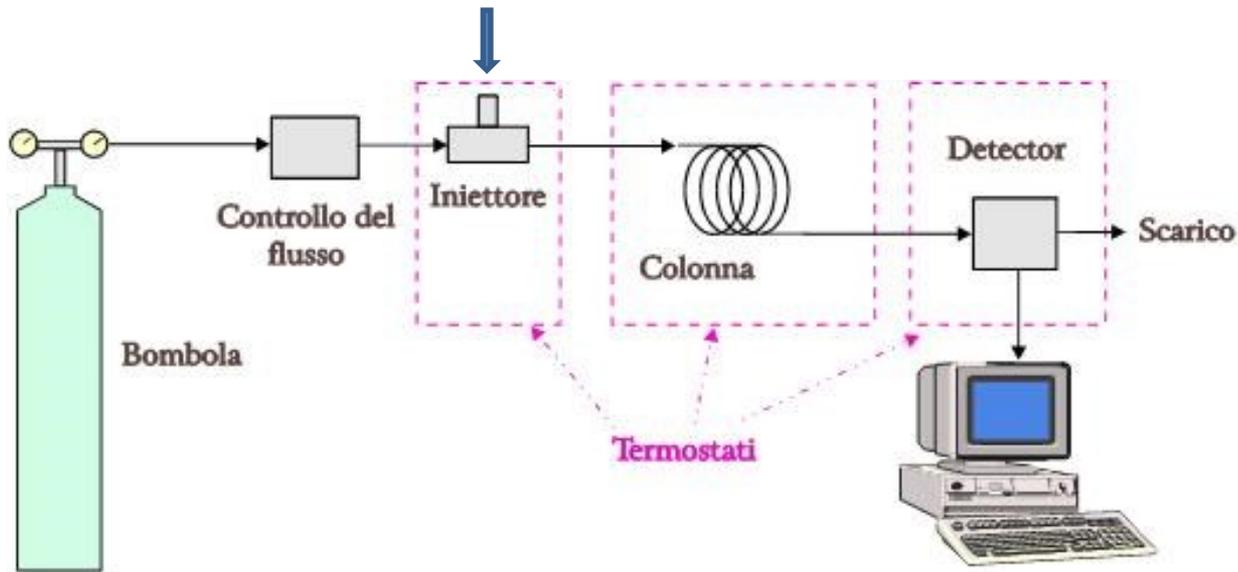
È un metodo di indagine prettamente analitica, molto usato sia per soluzioni di liquidi che per miscele di gas perché è molto efficiente e molto sensibile.

la **fs** è un solido o un liquido supportato su un solido dentro ad una colonna d'acciaio.

la **fm** è un gas inerte e poco viscoso: di solito **He**

Non si può adoperare per proteine, a.a., dna, rna e altro materiale biologico

# Schema di un gascromatografo



Pochi  $\mu\text{l}$  della soluzione da analizzare vengono iniettati in una camera di vaporizzazione ad alta temperatura comunicante con una colonna in acciaio molto sottile (1 mm o meno) e della lunghezza di molti m (anche 200 m) riempita di **fs** e che viene mantenuta a temperatura costante di solito piuttosto elevata (fino a 350 °C) per mantenere tutti i componenti in fase gassosa. He è la **fm**

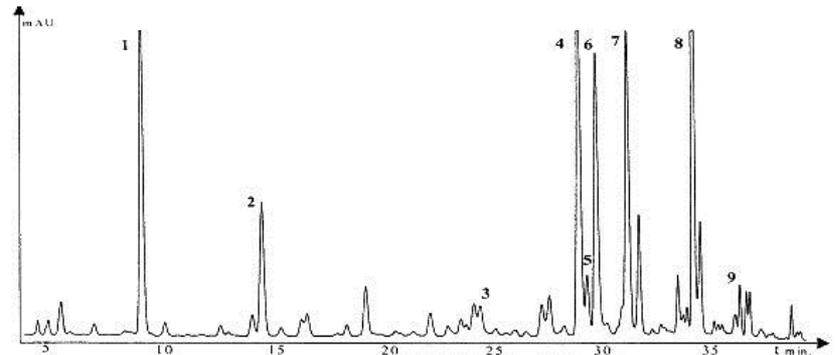
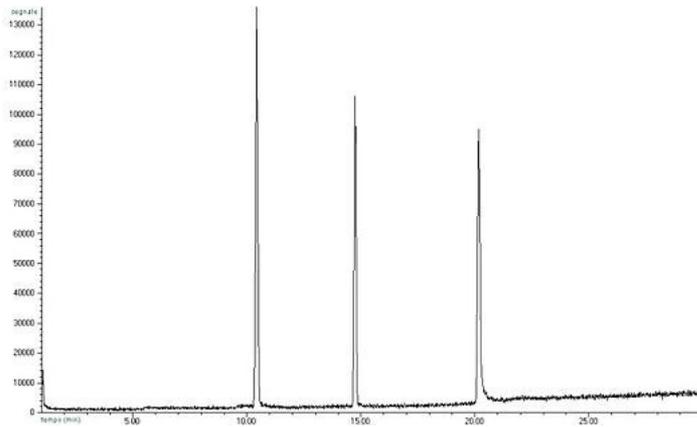


gascromatografo

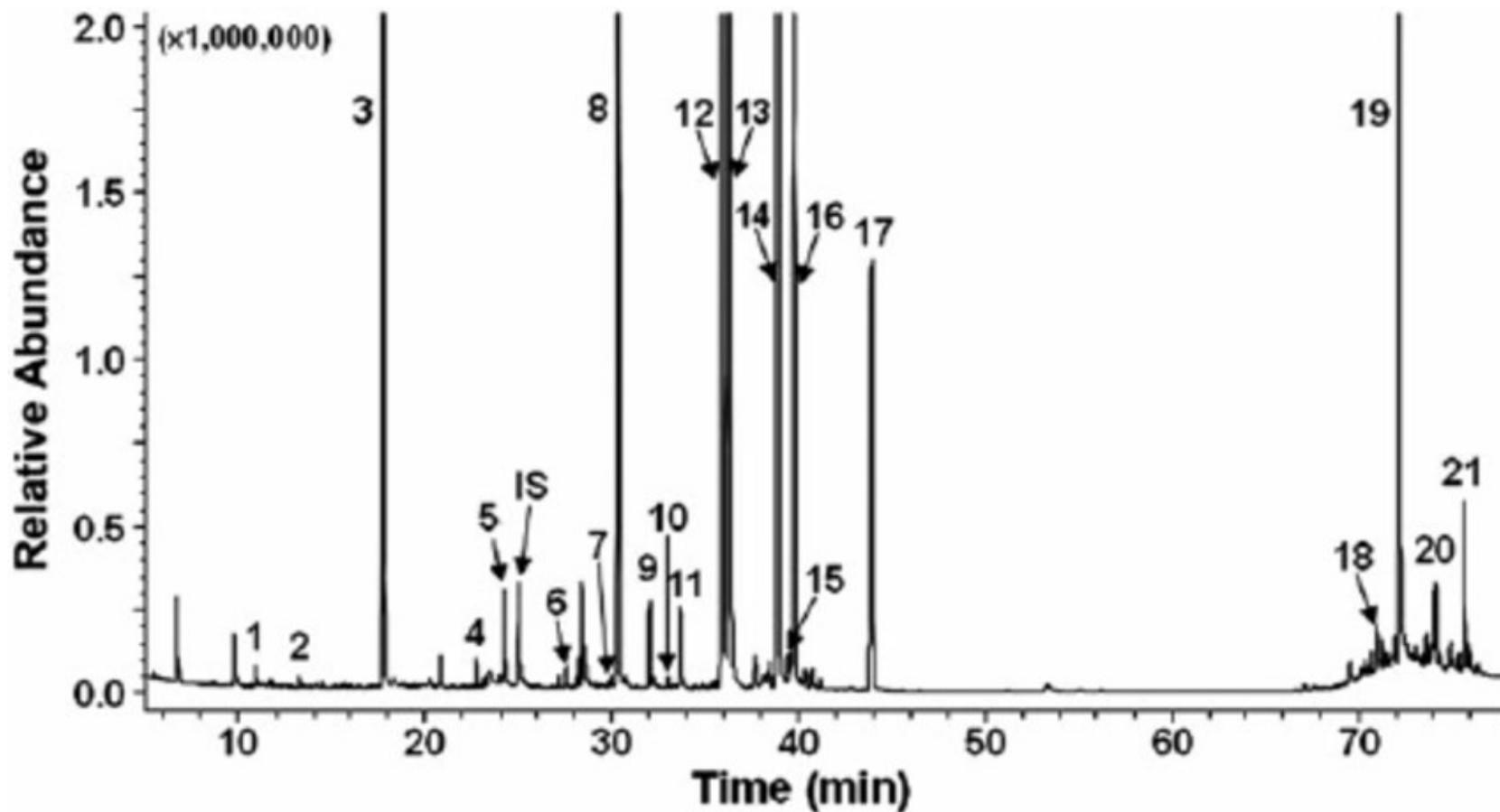


colonne per  
gascromatografia

I componenti in fase gassosa sono eluiti (spinti) all'uscita della colonna dal He dove appositi rivelatori molto sensibili segnalano l'uscita delle sostanze separate che sono in quantità piccolissime.



Es. di gascromatogrammi per 3 e per oltre 50 sostanze.



Gaschromatogramma dei componenti delle fragranze di una fragola

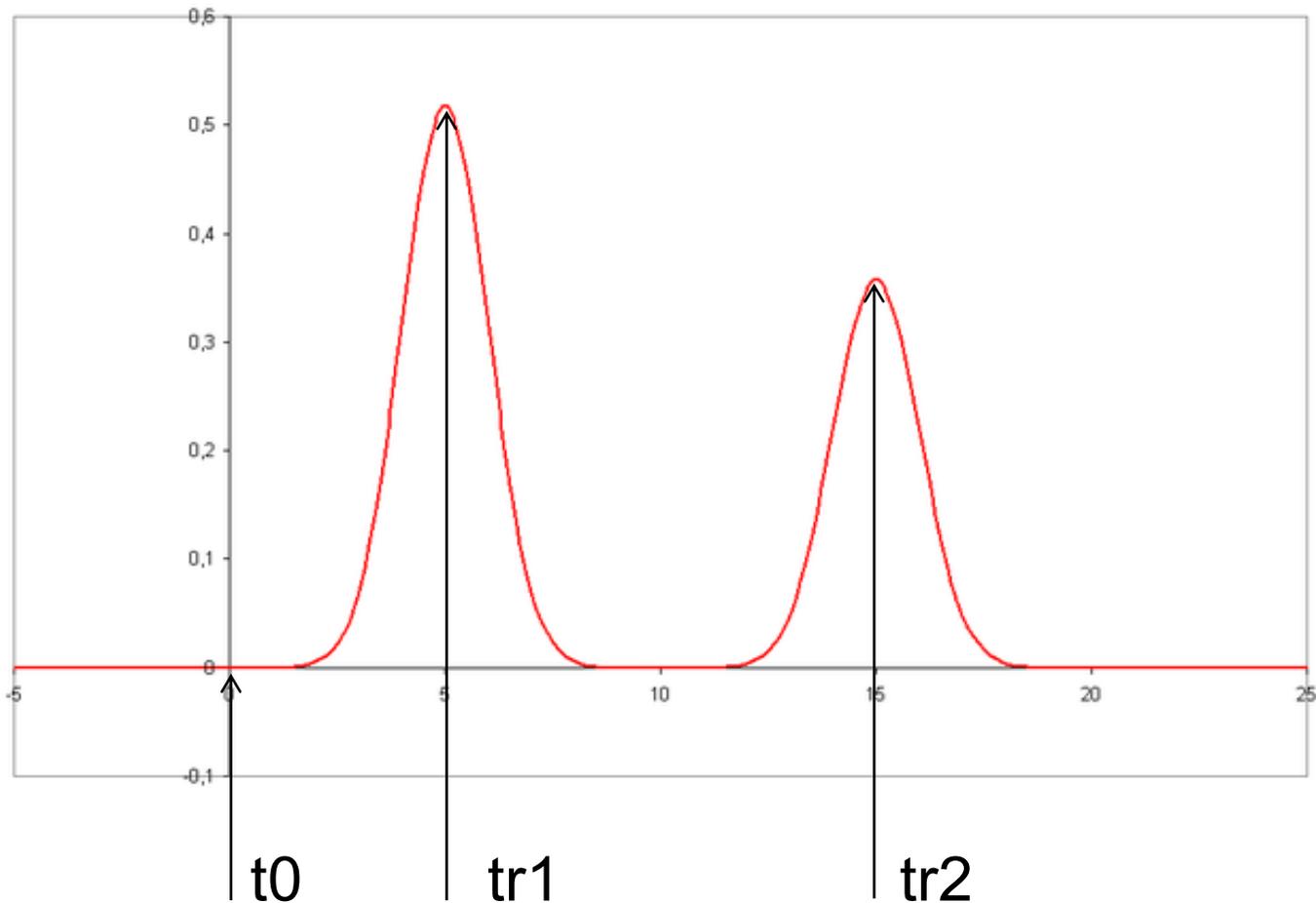
# RICONOSCIMENTO DI UNA SOSTANZA

Come si assegnano i picchi e quindi si riconoscono le sostanze dal cromatogramma

- 1) tempo di ritenzione
- 2) metodo delle aggiunte

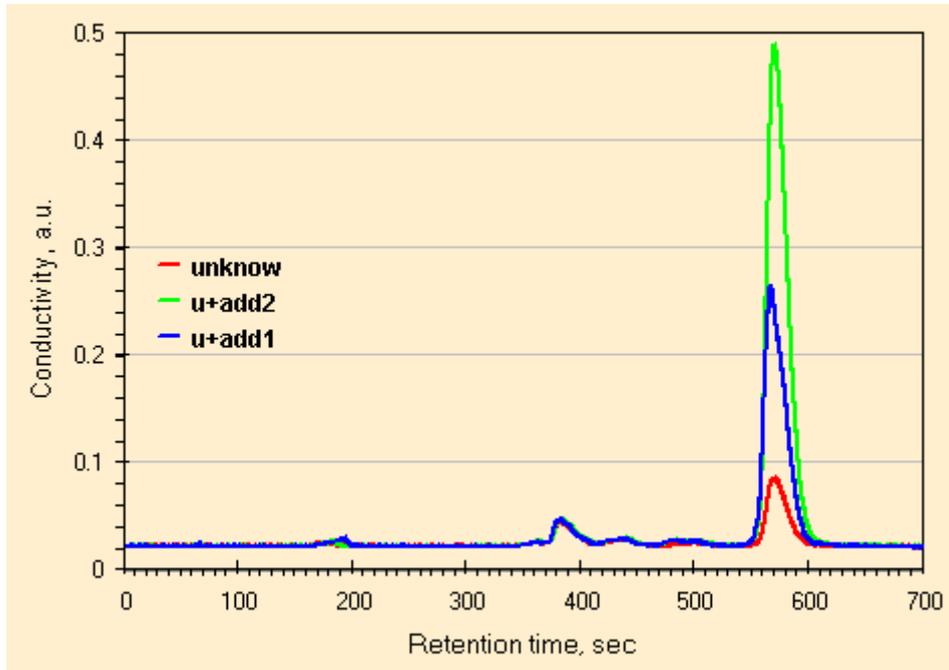
si possono riconoscere le sostanze (analisi qualitativa: gas-cromatografia, HPLC, gel-elettroforesi, TLC, ...)

si possono determinare le concentrazioni (analisi quantitativa: gas-cromatografia, HPLC, gel-elettroforesi, ...)

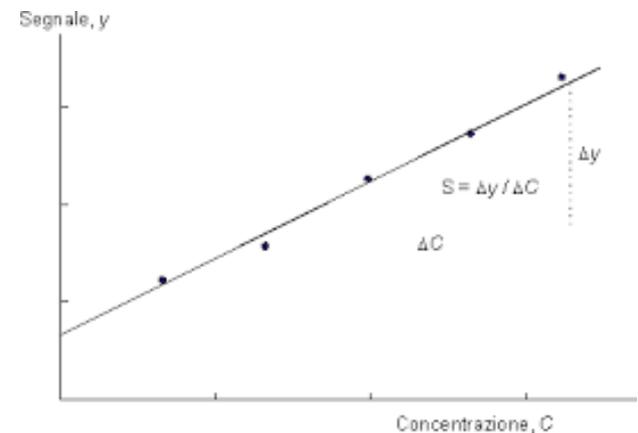


**Riconoscimento della sostanza dai tempi di ritenzione** caratteristici e tabulati per ogni sostanza in condizioni riproducibili di temperatura e altre condizioni sperimentali (tipo di fm e fs, flusso di gas, lunghezza e sezione della colonna,...)

metodo dell'aggiunta standard multipla per il riconoscimento qualitativo e la determinazione quantitativa della specie in esame

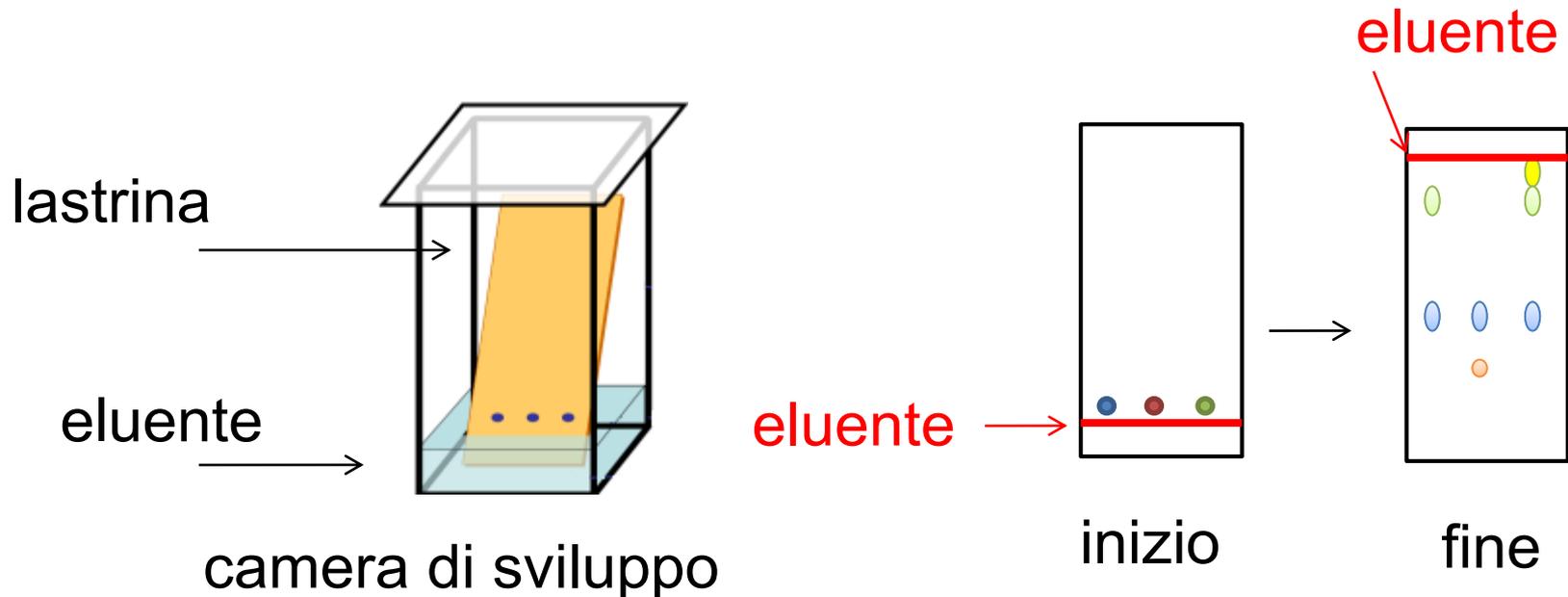


curva di taratura



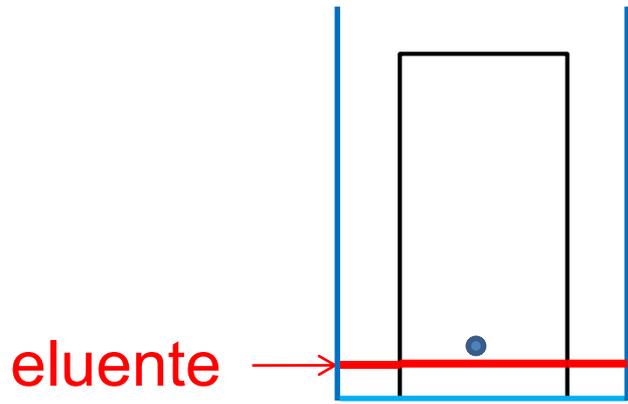
# IN PARTICOLARE: CROMATOGRAFIA SU STRATO SOTTILE (TLC)

Tecnica di **analisi** che viene diffusamente adoperata in laboratorio per separare soluti a scopi analitici.



# TLC animata

Tavagnacco 2015



lastrina in un becker  
(camera di eluizione)

I vari soluti contenuti nella goccia iniziale si separano a mano a mano che l'eluente sale per capillarità spingendo i componenti della goccia lungo la lastrina coperta da  $\text{SiO}_2$  o  $\text{Al}_2\text{O}_3$  a differenti velocità.