METODI CROMATOGRAFICI

La cromatografia, tra le molteplici tecniche che sono state sviluppate per la preparazione di sostanze organiche pure, costituisce uno dei metodi di separazione più convenienti ed efficaci.

Benchè essa sia differenziata in numerose tecniche operative, tutti i metodi cromatografici di separazione sono basati sul principio dell'adsorbimento o della ripartizione. Il nome cromatografia deriva dal fatto che le prime separazioni cromatografiche, risalenti agli inizi del secolo, furono eseguite su sostanze colorate.

La cromatografia consiste in una continua successione di processi di trasferimento: i singoli componenti la miscela da separare si distribuiscono infatti in modo differente tra due fasi tra loro non miscibili, una fissa e l'altra mobile. La prima, detta fase stazionaria, è sempre costituita da un solido o da un liquido opportunamente fissato a un supporto solido mentre la fase mobile è sempre costituita da un liquido o un gas che viene fatta fluire con continuità attraverso la fase stazionaria.

La classificazione più semplice dei differenti metodi cromatografici è basata su tre distinti criteri: il principio su cui è fondata la separazione dei componenti; lo stato fisico di ambedue le fasi, mobile e stazionaria; la particolare tecnica con cui viene eseguito il processo cromatografico.

Tutti i processi di separazione avvengono in una "colonna cromatografica", indipendentemente dalla tecnica usata: infatti una semplice striscia di carta da filtro, nonchè un sottile strato di adsorbente disteso su un supporto, costituiscono una cosiddetta "colonna aperta".

Nella **cromatografia di adsorbimento** la fase stazionaria è sempre costituita da una solido attivo, dotato cioè di proprietà adsorbenti, mentre la fase mobile è un solvente. La separazione si basa sull'adsorbimento selettivo dei vari componenti della miscela sui centri attivi della superficie della fase stazionaria e dipende da due fattori:

a) la forza con cui ciascun composto è adsorbito sulla fase stazionaria (che è funzione della polarità del composto);

b) la solubilità relativa dei componenti nell'eluente.

Le interazioni in gioco tra adsorbente e componenti della miscela da separare nella fase mobile sono molteplici e determinate da legami di tipo van der Waals, dipolo-dipolo, ad idrogeno, ionici, nonchè da equilibri di complessazione. Pertanto la forza con cui una sostanza organica è adsorbita sulla superficie della fase solida dipende principalmente dalla natura dei suoi gruppi funzionali. Poichè il materiale di cui è costituito l'adsorbente è relativamente polare (allumina, silice), quanto più è polare il gruppo funzionale tanto è maggiore la forza con cui la sostanza viene adsorbita sulla fase stazionaria. L'affinità relativa delle varie classi di composti organici nei confronti di fasi stazionari adsorbenti varia secondo il seguente ordine approssimativo:

idrocarburi saturi< alchini, alcheni, idrocarburi aromatici< eteri< esteri, chetoni, aldeidi< ammine, tioli, alcoli< fenoli, acidi carbossilici.

I soluti meno polari sono poco trattenuti e migrano più rapidamente sotto l'azione della fase mobile, e pertanto sono eluiti per primi. Oltre alla polarità, altri fattori influenzano la separazione cromatografica: ad es. la forza dell'adsorbimento dipende dalle caratteristiche stereochimiche e dalla geometria della molecola che interagisce con l'adsorbente, per cui composti strutturalmente simili (isomeri di struttura, diastereoisomeri) possono presentare comportamenti cromatografici differenti.

Numerosi sono i solventi che possono essere utilizzati come fase mobile. In genere, il potere eluente di un solvente varia in funzione della polarità, del tipo di adsorbente adoperato, della natura delle sostanze da separare e della temperatura.

Sebbene non sia possibile una rigorosa classificazione dei solventi in funzione del potere eluente, tuttavia è conveniente definire un ordine generale (serie eluotropica) che può aiutare nella scelta della fase mobile. Esistono varie serie eluotropiche, di cui la più nota è quella di Trappe (i solventi sono elencati secondo un potere eluente crescente):

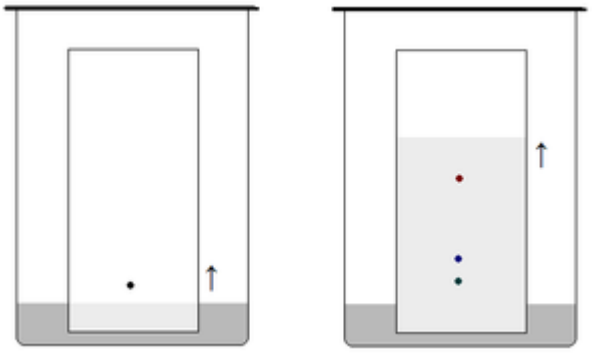
etere di petrolio< cicloesano< tetracloruro di carbonio< toluene< cloruro di metilene< cloroformio< etere etilico< acetato di etile< acetone< propanolo< etanolo< metanolo< acqua< acido acetico.

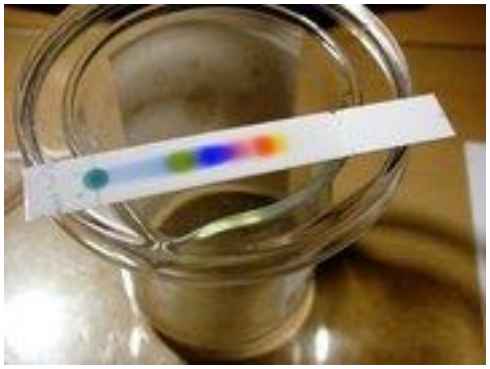
E' possibile utilizzare tali solventi in miscele di varia composizione, così da realizzare fasi mobili con potere eluente variabile.

La **cromatografia su strato sottile** e la **cromatografia su colonna** costituiscono due tipi di cromatografia di adsorbimento ampiamente utilizzate in un laboratorio di chimica organica.

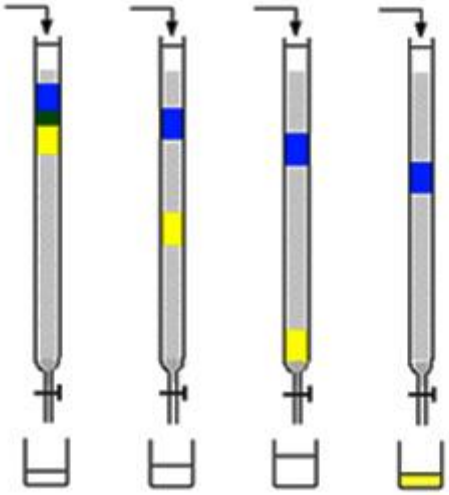
Nella **Cromatografia su strato sottile (TLC: thin layer chromatography)** la fase stazionaria è costituita da un sottile strato di adsorbente (gel di silice o allumina) mescolato con un opportuno legante, quale ad es. gesso, fatto aderire su di una lastra di vetro o poliestere che agisce da supporto.

Il campione viene caricato su un punto della lastra cromatografica ed eluito dalla fase mobile che sale lungo la lastra cromatografica per capillarità.





Nella **cromatografia su colonna** si utilizzano delle colonne di vetro riempite di materiale adsorbente (fase stazionaria) all’interno della quale viene poi fatto percolare l’eluente (fase mobile).



Le dimensioni della colonna variano in funzione della quantità di sostanza da separare. Per quanto riguarda la quantità di adsorbente da utilizzare è bene avere un rapporto 1/20-50 miscela/adsorbente dipendentemente dai componenti da separare.

Il riempimento della colonna (impaccamento) può essere fatto in due modi:

- Impaccamento a umido (si prepara separatamente in un becker la sospensione di fase stazionaria nell'eluente e poi si versa il tutto in colonna).
- Impaccamento a secco (si introduce in colonna la fase stazionaria secca e successivamente si fa percolare l'eluente fino ad ottenere una fase di aspetto omogeneo).

Successivamente si introduce la miscela da separare e si inizia ad aggiungere l'eluente raccogliendo ciò che esce dalla colonna in provette. Il contenuto delle provette sarà analizzato alla TLC per vedere dove si trovano i vari componenti.

Nella **cromatografia di ripartizione** la fase stazionaria è generalmente un sottile strato di liquido adsorbito sulla superficie di un supporto inerte, mentre la fase mobile può essere un liquido (cromatografia di ripartizione liquido-liquido) o un gas (cromatografia di ripartizione gas-liquido). La separazione di una miscela si basa sulla diversa ripartizione dei componenti tra le due fasi. I due liquidi tra cui si ripartiscono i componenti di una miscela devono essere immiscibili o solo parzialmente miscibili e devono differire in polarità. I materiali di supporto più comuni sono il gel di silice, con particelle di dimensioni analoghe a quelle utilizzate nella cromatografia di adsorbimento , silicati di magnesio e polvere di cellulosa. La fase stazionaria è costituita da acqua o soluzioni acquose tamponate, acido cloridrico o solforico diluiti, metanolo. Come fase mobile si utilizzano solventi meno polari quali miscele di butanolo-cloroformio, butanolo-benzene, acetato di etile, esano.

La cromatografia su carta rappresenta un importante esempio di ripartizione liquido-liquido. Si utilizza in genere la carta da filtro altamente idrofilica ricoperta di un sottile strato di acqua, circa 2%, trattenuta dalle fibre di cellulosa. La fase mobile è costituita da una miscela di acqua e uno o più solventi organici.