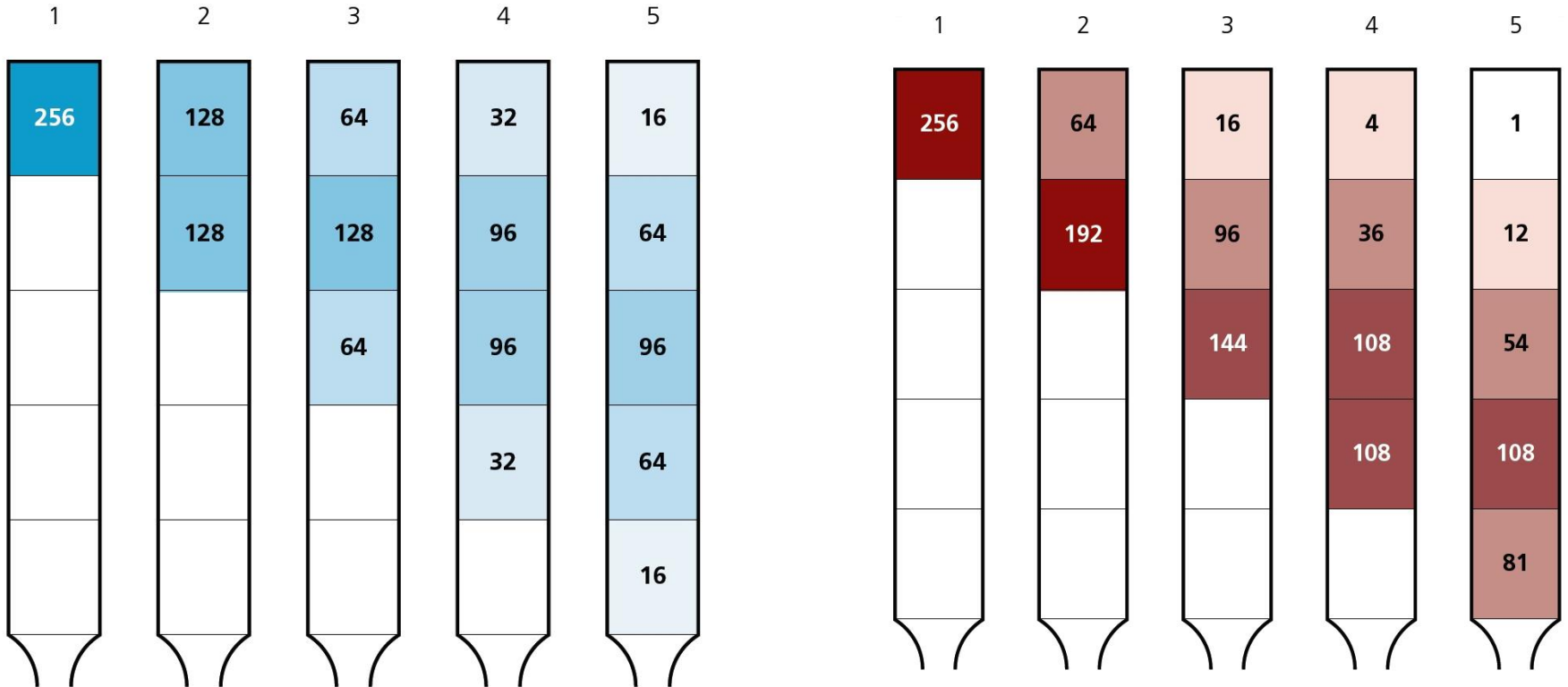


Tecniche CROMATOGRAFICHE – parte seconda

Effetto del diverso K_D sulla separazione



?

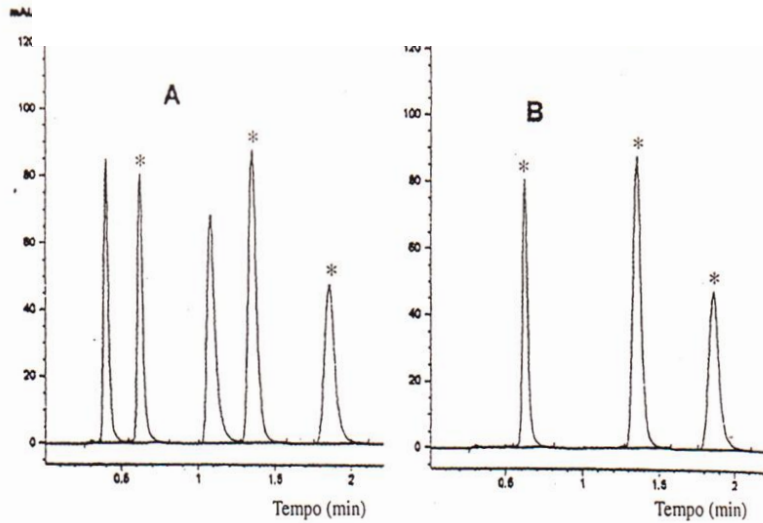
$$K_D = \frac{\text{fase stazionaria}}{\text{fase mobile}}$$

?

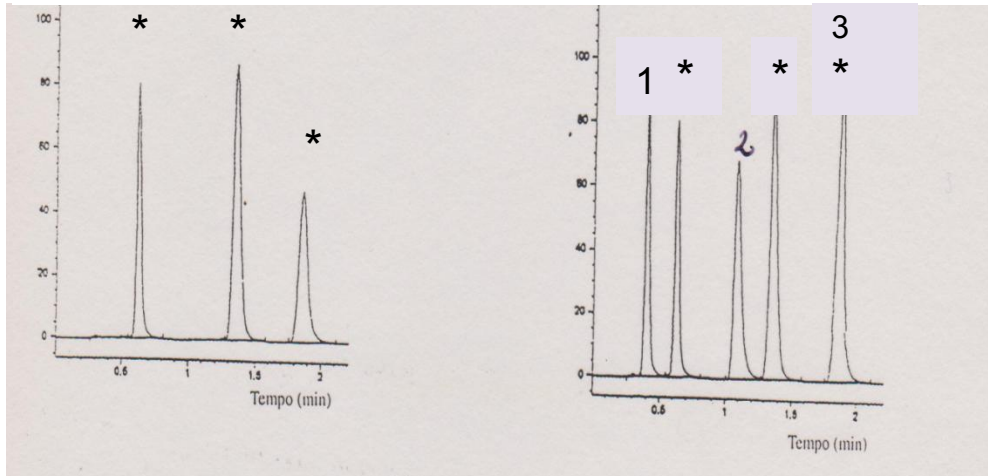
ANALISI QUALITATIVA

Miscela Standard

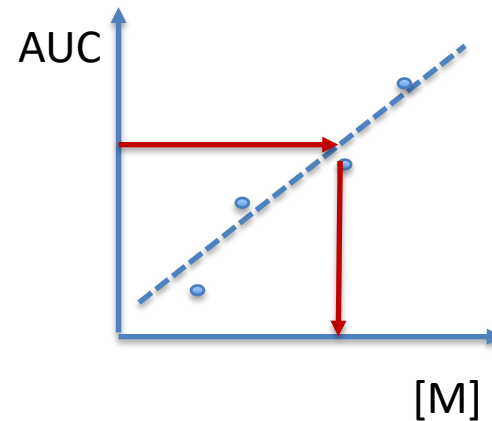
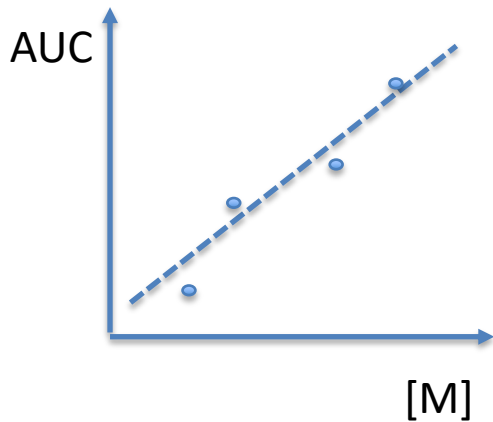
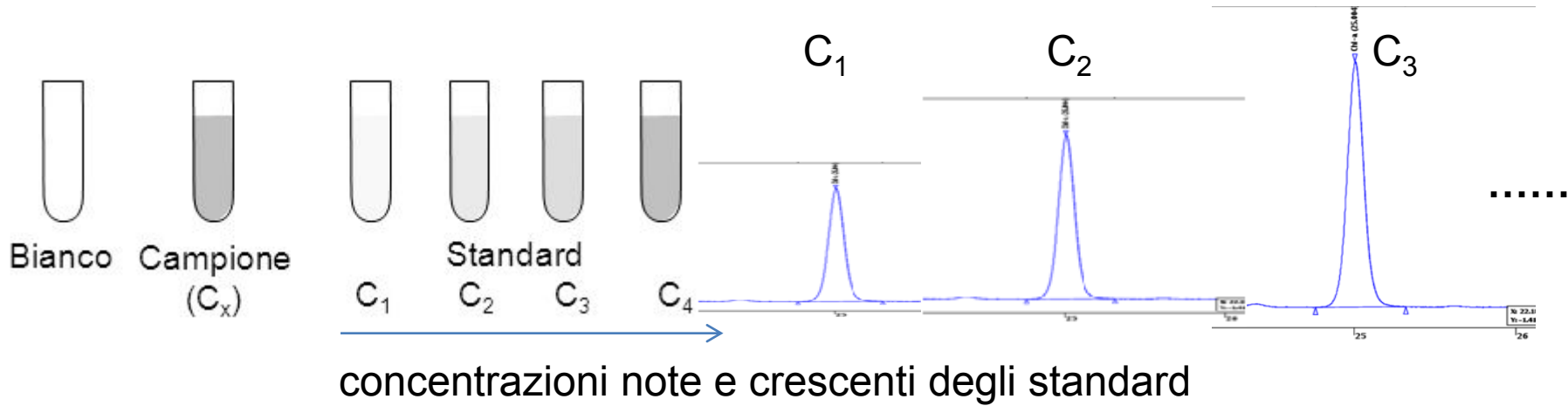
Campione



Confronto dei tempi di ritenzione tra due cromatogrammi. A) miscela di standards e B) campione. I picchi contrassegnati con asterisco indicano analiti con tempi di ritenzione simili sia nel campione e sia nella miscela standard.



ANALISI QUANTITATIVA



Ricavo concentrazione dell'analita

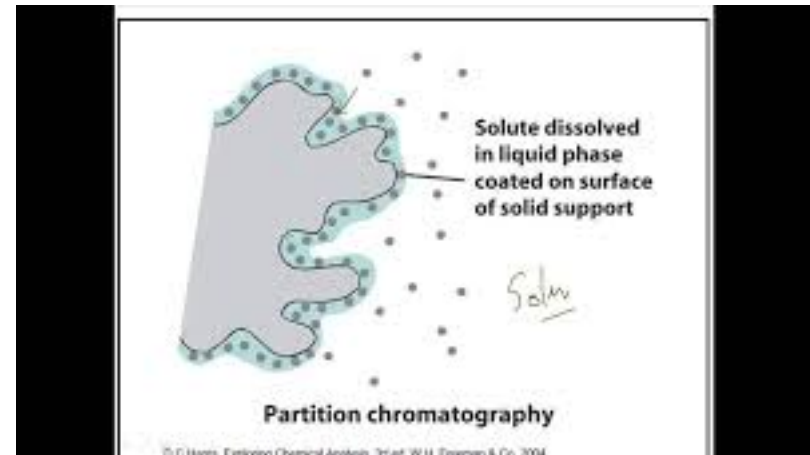
Cromatografia di ripartizione

La fase stazionaria è un liquido che impregna un solido granulare inerte o è ad esso chimicamente legato; in questo liquido le molecole da separare sono solubili.

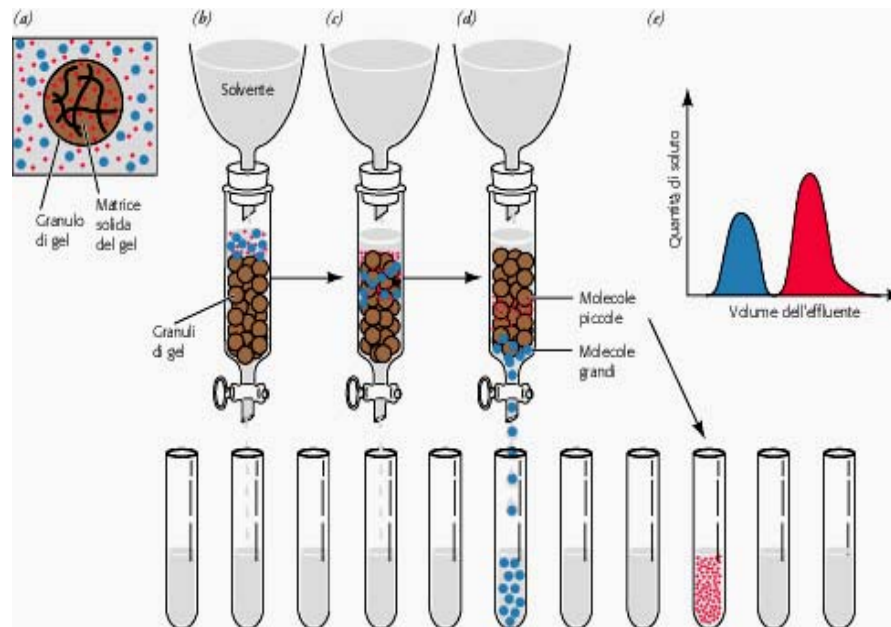
Durante l'eluizione le molecole si ripartiscono dinamicamente tra le due fasi secondo la diversa solubilità di ognuna.

La cromatografia di ripartizione può essere gas-liquido o liquido-liquido a seconda della natura della fase mobile.

La cromatografia di ripartizione è chiamata **in fase normale** se la fase stazionaria è più polare della fase mobile, mentre è chiamata **fase inversa** se la fase stazionaria è meno polare della fase mobile. Si tratta della tecnica più comunemente impiegata per la separazione di sostanze organiche



CROMATOGRAFIA di ESCLUSIONE (SEC: size exclusion chromatography)



Separare i componenti di una miscela in base alle **dimensioni molecolari**

fase stazionaria: polimero in forma di gel

fase mobile: può essere un solvente organico, e in tal caso si parla di Gel Permeation Chromatography (GPC), oppure acqua o una soluzione tampone, e si parla di Gel Filtration Chromatography (GFC).

La cromatografia di esclusione molecolare o Gel filtrazione può essere utilizzato per:

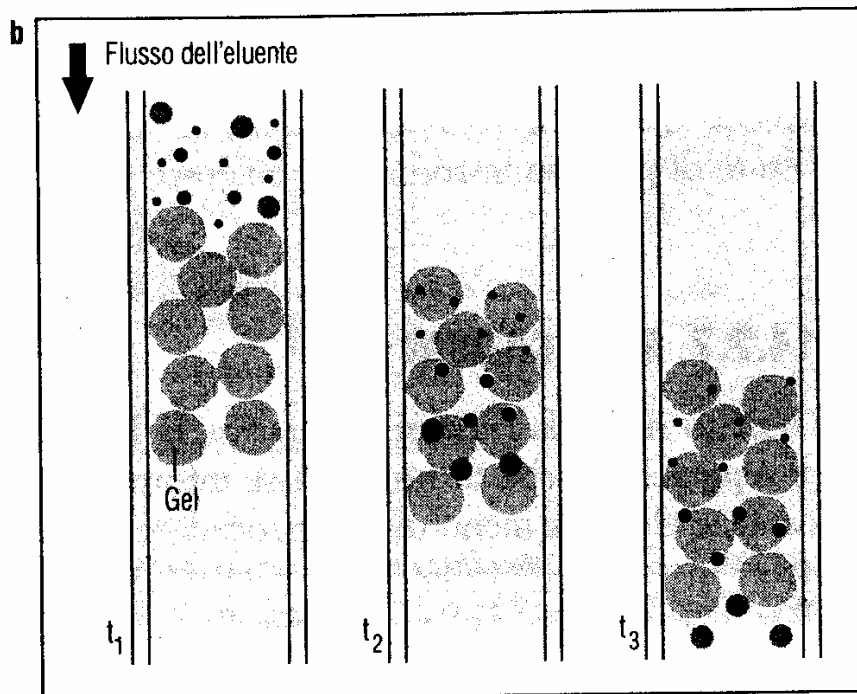
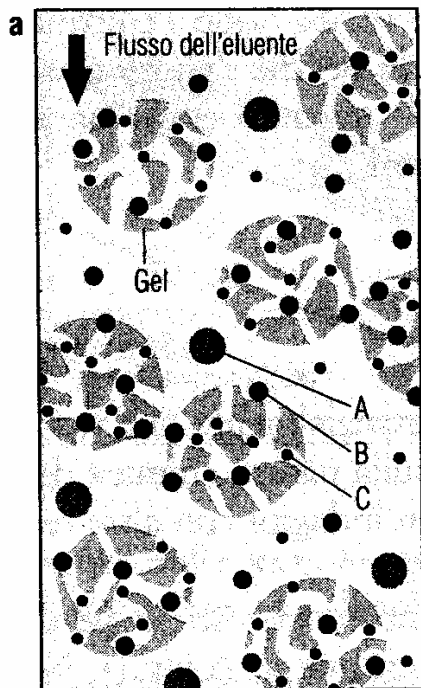
Purificazione di DNA o proteine

Modifica del tampone

Separazione di molecola in gruppi

Allontanare contaminanti a basso peso molecolare (per es. sali)

Allontanare prodotti, cofattori o inibitori dagli enzimi



Anche in questo caso abbiamo dei parametri fissi di cui tener conto:

Il **volume morto** (V_0) è il volume di colonna non occupato dalle particelle del gel;

Il **volume interno** (V_i) è il volume dei pori presenti nelle particelle di gel;

Il volume totale della fase mobile in colonna o semplicemente **volume totale** (V_t) è tutto il volume a disposizione delle particelle della miscela, cioè:

$$V_t = V_0 + V_i + V_{\text{matrix}}$$

Il **volume di ritenzione** (V_R), detto anche **volume di eluizione** (**V_e**), è il volume di fase mobile eluita dal momento dell'ingresso fino all'uscita dalla colonna di una determinata sostanza. Tale volume viene misurato in corrispondenza del massimo del relativo picco cromatografico

Il **volume di ritenzione corretto** (V'_e) viene definito in modo del tutto analogo a quello per le altre tecniche cromatografiche:

$$V'_e = V_R - V_0$$



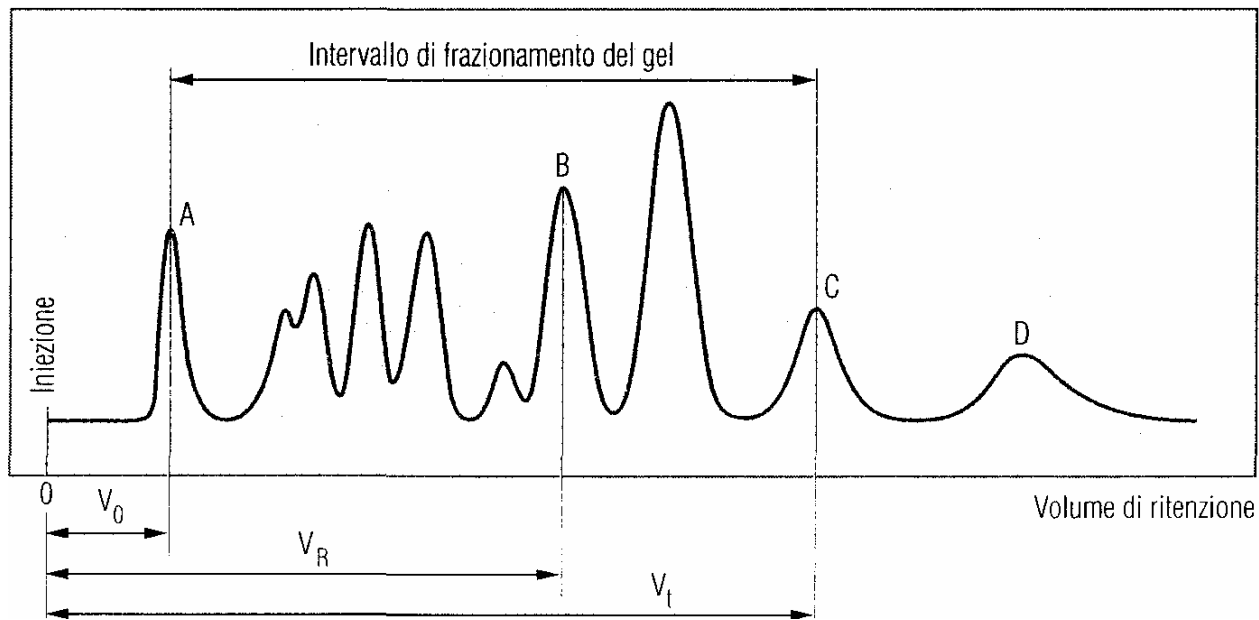
V_0



V_i



V_t



$$V_e = V_0 + K_d V_i$$

Ricavando K_d dalla precedente equazione si ottiene:

$$K_d = \frac{V_e - V_0}{V_i}$$

Dove $V_i = V_t - V_0 - V_{\text{matrice}}$

K_d è il coefficiente di distribuzione ($0 \div 1$) che esprime la frazione del volume dei pori (V_i) accessibile alle molecole di una determinata sostanza.



Allora...

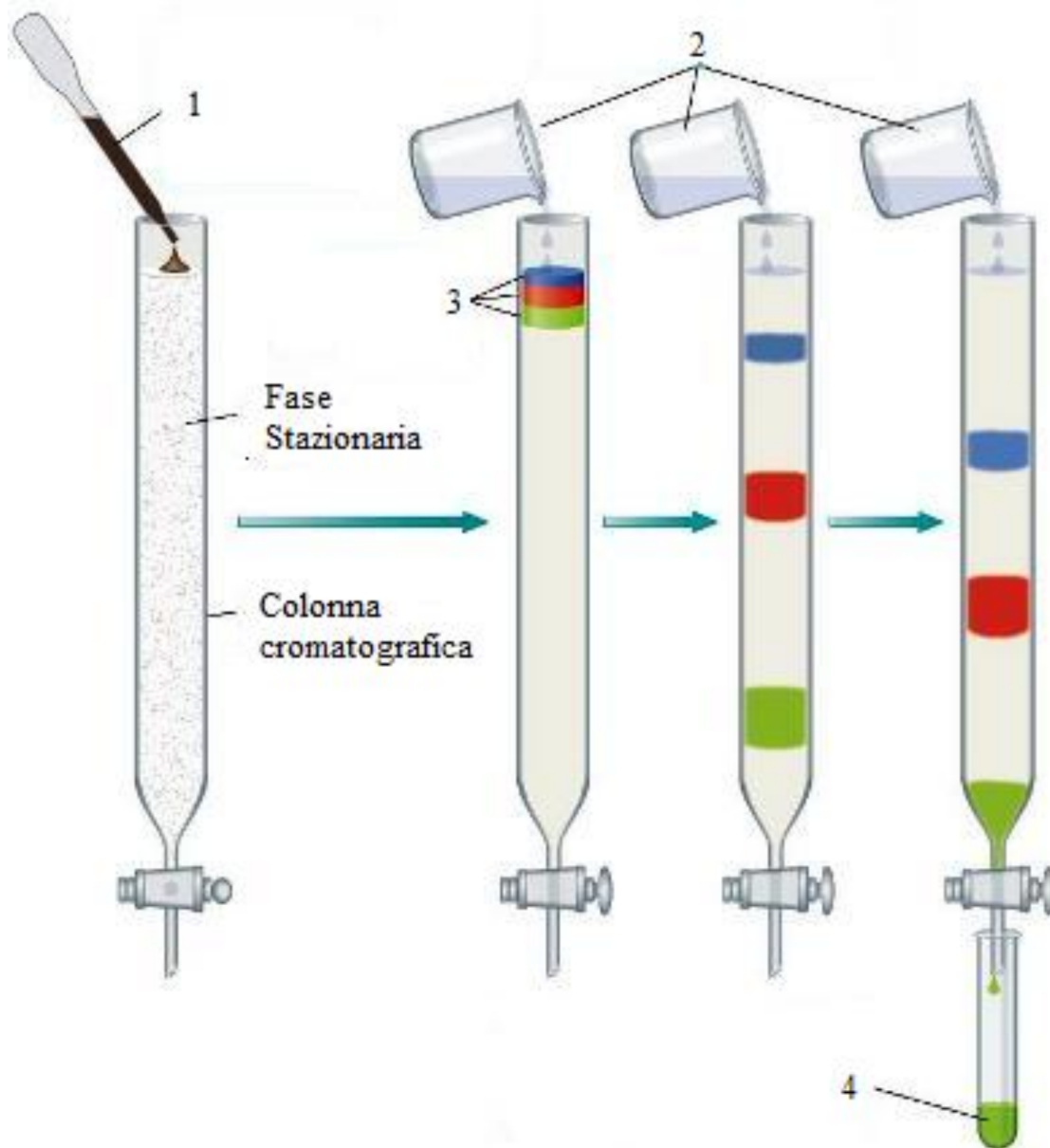
$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0}$$

POSSO RICAVARLO DAL TRACCIATO CROMATOGRAFICO

DIPENDE DALLA TIPOLOGIA DEL GEL

La **risoluzione** massima nella cromatografia di filtrazione su gel **dipende dall'applicazione** del campione in un piccolo volume, tipicamente **1–5% del volume totale del letto**

La massima **risoluzione** nella cromatografia per filtrazione su gel si **ottiene con colonne lunghe**. Il rapporto tra il diametro della colonna e la lunghezza può variare da **1:20 fino a 1:100**.



Proprietà dei gel

Limite di esclusione

Esprime la **massa molare** della più piccola molecola che viene **esclusa** dai pori di gel.

Limite di permeazione

Esprime la **massa molare** della più grande molecola che **può penetrare** in tutto il volume interno del gel

Intervallo di frazionamento

Intervallo delle masse molari delle molecole che vengono frazionate dal gel

Distribuzione dei pori

Le dimensioni dei pori di un determinato gel non sono tutte uguali, ma si distribuiscono entro un intervallo (mesh)

Le particelle di gel possono essere di forma irregolare oppure sferica; quella sferica, ovviamente, è la forma ideale

La qualità della separazione è tanto migliore quanto più ristretto è l'intervallo in cui si distribuiscono le dimensioni delle particelle
In genere, si usano granulometrie da 100 a 200 mesh, ma anche fino a 400 mesh

Il gel viene preparato miscelando il polimero disidratato con un solvente opportuno; questo comporta una espansione del polimero e quindi un **rigonfiamento** delle particelle. La quantità di solvente assorbita per ogni grammo di gel secco dipende dalla dimensione dei pori.

Normalmente sono indicazioni che vengono fornite dalla casa produttrice

TABLE 5.2 Mesh Sizes of Adsorbents and Typical Applications

| Mesh Sizes | Applications |
|-------------------|---|
| 20–50 | Crude preparative work, very high flow rate |
| 50–100 | Preparative applications, high flow rate |
| 100–200 | Analytical separations, medium flow rate |
| 200–400 | High-resolution analytical separations, low flow rate |

I gel sono di vari tipi: morbidi, semirigidi e rigidi.

- Agarosio** E' un polisaccaride derivante da particolari alghe rosse costituito da residui alternati di D-galattoso e 3,6-anidro-L-galattoso. Disponibile commercialmente come Sepharose, Sepharose CL (cross-linking con 2,3-dibromopropanolo), Superose, Bio-Gel A. Limiti di esclusione 10-40000 kD.
- Cellulosa** Polimero di unita' glucosidiche unito da legami β -1,4. Tramite epicloridrina vengono ottenuti i legami crociati essenziali per l' utilizzo come matrice in cromatografia, il numero dei quali determina la dimensione dei pori.
- Destrano** E' un polimero di residui di glucosio uniti da legami β -1,6 prodotto dal batterio *Leuconostoc mesenteroides*. E' presente in commercio con il nome di Sephadex. La porosita' dei gel a base di destrano e' controllata dalla massa molecolare del destrano usato e dall' introduzione di legami crociati ottenuti con epicloridrina. Limiti di esclusione 0.7-800 kD. Il cosiddetto Sephacryl e' destrano con legami crociati ottenuti con N,N'-metilene bisacrilamide. Limiti di esclusione 1-8000 kD. Il Superdex e' un gel composito costituito da destrano covalentemente legato ad agarosio.
- Poliacrilamide** E' un polimero di acrilamide e N,N'-metilenebisacrilamide (quest'ultimo determina la formazione di legami crociati). E' disponibile in commercio come Bio-GelP, con limiti di esclusione tra 0.2 e 400 kD.
- Polistirene** E' un polimero di stirene legato con divinilbenzene.
- Silice** E' un polimero prodotto a partire dall' acido ortosilicico. I molti gruppi silanolo (Si-OH) rendono la matrice altamente idrofilica. Il loro eccesso puo' essere eliminato derivatizzando con triclorometilsilano.

Sephadex

Chemical and physical properties

Sephadex is a bead-formed gel prepared by cross-linking dextran with epichlorohydrin (Fig. 22). Table 5 lists the different G-types of Sephadex and their physical properties.

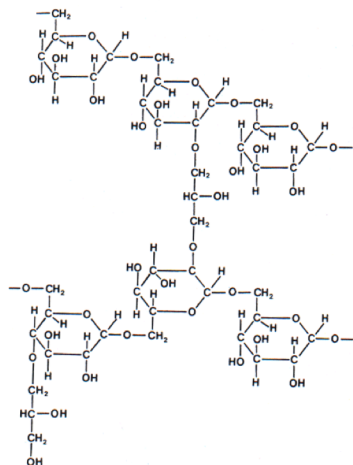


Fig. 22. Partial structure of Sephadex.

Sephadex

separation Pharmacia dextran

Table 5. Properties of Sephadex.

| Gel type | Dry bead size μm | Fractionation range | | Swelling factor ml/g |
|--------------------------|--------------------------------|----------------------|-----------------|-------------------------|
| | | Globular proteins | Dextrans | |
| Sephadex G-10 | 40 - 120 | - 700 | - 700 | 2 - 3 |
| Sephadex G-15 | 40 - 120 | - 1 500 | - 1 500 | 2.5 - 3.5 |
| Sephadex G-25 Coarse | 100 - 300 | 1 000 - 5 000 | 100 - 5 000 | 4 - 6 |
| Sephadex G-25 Medium | 50 - 150 | 1 000 - 5 000 | 100 - 5 000 | 4 - 6 |
| Sephadex G-25 Fine | 20 - 80 | 1 000 - 5 000 | 100 - 5 000 | 4 - 6 |
| Sephadex G-25 Superfine | 10 - 40 | 1 000 - 5 000 | 100 - 5 000 | 4 - 6 |
| Sephadex G-50 Coarse | 100 - 300 | 1 500 - 30 000 | 500 - 10 000 | 9 - 11 |
| Sephadex G-50 Medium | 50 - 150 | 1 500 - 30 000 | 500 - 10 000 | 9 - 11 |
| Sephadex G-50 Fine | 20 - 80 | 1 500 - 30 000 | 500 - 10 000 | 9 - 11 |
| Sephadex G-50 Superfine | 10 - 40 | 1 500 - 30 000 | 500 - 10 000 | 9 - 11 |
| Sephadex G-75 | 40 - 120 | 3 000 - 80 000 | 1 000 - 50 000 | 12 - 15 |
| Sephadex G-75 Superfine | 10 - 40 | 3 000 - 70 000 | 1 000 - 50 000 | 12 - 15 |
| Sephadex G-100 | 40 - 120 | 4 000 - 150 000 | 1 000 - 100 000 | 15 - 20 |
| Sephadex G-100 Superfine | 10 - 40 | 4 000 - 100 000 | 1 000 - 100 000 | 15 - 20 |
| Sephadex G-150 | 40 - 120 | 5 000 - 300 000 | 1 000 - 150 000 | 20 - 30 |
| Sephadex G-150 Superfine | 10 - 40 | 5 000 - 150 000 | 1 000 - 150 000 | 18 - 22 |
| Sephadex G-200 | 40 - 120 | 5 000 - 600 000 | 1 000 - 200 000 | 30 - 40 |
| Sephadex G-200 Superfine | 10 - 40 | 5 000 - 250 000 | 1 000 - 150 000 | 20 - 25 |

G-10 is well suited for the separation of biomolecules such as peptides (MW>700) from smaller molecules (MW <100).

G-25 is recommended for the majority of group separations involving globular proteins. These media are excellent for removing salt and other small contaminants away from molecules that are greater than MW 5000. Using different particle sizes enables columns to be packed according to application requirements, see Table 5.1. The particle size determines the flow rates and the maximum sample volumes that can be applied. For example, smaller particles give higher column efficiency (narrow, symmetrical peaks), but may need to be run more slowly as they create higher operating pressures.

G-50 is suitable for the separation of molecules MW >30 000 from molecules MW <1 500 such as labeled protein or DNA from unconjugated dyes. The medium is often used to remove small nucleotides from longer chain nucleic acids.

G-100 is recommended for molecular weight determination

Fase mobile

Si possono usare **soluzioni acquose saline** oppure **solventi organici**.

Nella preparazione delle soluzioni saline occorre tenere sotto controllo alcuni fattori

Alcune separazioni devono essere eseguite a pH ben determinati. E ogni gel ha un ben preciso campo di applicazione, al di fuori del quale possono verificarsi idrolisi o modificazioni della struttura del polimero.

Gli agenti ossidanti devono essere evitati, perché causano modificazioni nella struttura dei polimeri.

Per evitare la formazione di bolle nella colonna, i gas disciolti nell'eluente (soprattutto CO₂) devono essere eliminati.

Quali sono le caratteristiche di cui tener conto per la scelta della colonna:

- **il tipo di separazione** che si intende effettuare (suddivisione in due o più frazioni o gruppi);
- **l'intervallo di frazionamento** del gel;
- **l'intervallo di distribuzione** delle masse molari dei componenti del campione.

Le colonne per SEC sono di vetro borosilicato oppure di plastica (trasparente e inerte), con elevata resistenza meccanica

IMPIEGHI SPERIMENTALI

Purificazione: le molecole di interesse devono cadere entro l'intervallo di separazione dello specifico gel usato, quindi per scegliere una certa matrice per la purificazione dobbiamo avere un'idea preliminare delle dimensioni o del peso molecolare della particella.

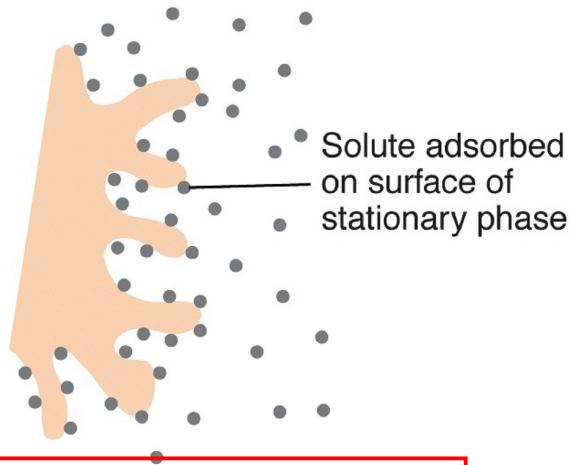
Determinazione del peso molecolare di proteine: il tempo di ritenzione per le proteine globulari dipende come detto dalle dimensioni e quindi dalla massa molecolare. Per una data colonna, i tempi di ritenzione di diverse proteine globulari dipendono linearmente dalla massa delle proteine stesse

Dissalazione: si possono separare soluti ad alto peso molecolare dai sali o dai solventi organici usando colonne impaccate con una resina per gel- filtrazione a pori piccoli (ad es., una Sephadex G-25; comunque, il limite di esclusione del gel deve essere inferiore alle dimensioni della macromolecola d'interesse)

..altre tipologia di cromatografia di adsorbimento

La prima forma di cromatografia:

Alcuni materiali solidi, “adsorbenti”, trattengono le molecole sulla loro superficie.



Adsorption chromatography

F.S. solida fissa

F.M. liquida o gassosa

Sulla superficie dei granuli si trovano **siti attivi** che possono stabilire legami deboli (reversibili!) con le molecole della miscela da separare.

Si parla quindi di cromatografia di adsorbimento, che può essere gas- solido o liquido-solido a seconda della natura della fase mobile

I siti di adsorbimento possono essere occupati dall'**eluente** o dall'**analita**.

E' INDICATA PER SEPARARE MOLECOLE CON POLARITA' DIVERSE

Cromatografia a scambio ionico

Tale metodo permette di separare le molecole sulla base della **carica netta superficiale**

- carica totale
- densità di carica
- distribuzione della loro carica.

I gruppi che contribuiscono alla formazione della carica netta di una molecola, hanno diversi valori di pKa dipendenti dalla loro struttura e dal microambiente in cui si trovano.

La loro carica è strettamente dipendente dal pH

La cromatografia a scambio ionico si avvantaggia del fatto che il rapporto esistente tra la carica netta e il pH per una specifica proteina E' UNICO.

- alta capacità
- alto potere di risoluzione
- condizioni di separazione “non aggressive”
- versatile ampio spettro di applicazioni
- capacità di concentrazione dell’analita
- costi contenuti

Fase stazionaria: polimero inerte contenente siti attivi ionizzati o ionizzabili

- **Cellulose;** Hydrophilic surface, enhanced stability by cross-linking, inexpensive
- **Dextran;** Considerable swelling as a function of ionic milieu, improved materials by cross-linking)
- **Agarose;** Swelling is almost independent of ionic strength and pH, high binding capacity obtained by production of highly porous particles
- **Polyacrylamide;** Swelling behavior similar to dextran
- **Acrylate-copolymer;** High pH stability
- **Polystyrene-divinilybenzene;** Hydrophobic surface, low binding capacity for proteins
- **Coated polystyrene-divinilybenzene;** Hydrophilic surface
- **Silica;** Unstable at pH > 8, rigid particles
- **Coated Silica;** Hydrophilic surface [14]

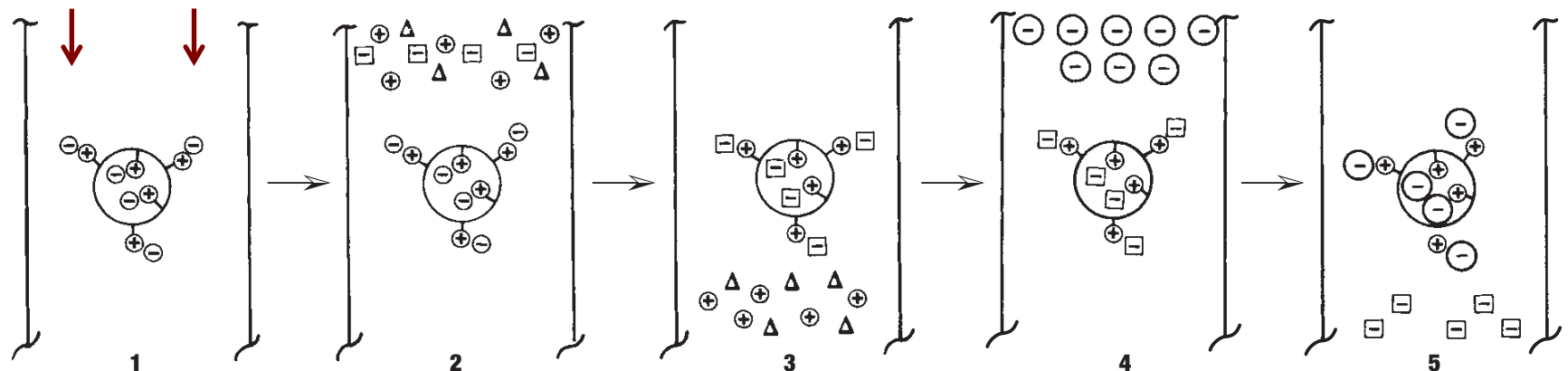


FIGURE 5.5 Illustration of the principles of ion-exchange chromatography. See text for explanation.

Le resine posso essere porose o non porose

Devono essere:

- fisicamente stabili
- Chimicamente resistenti anche a condizioni stringenti di lavaggio
- Avere bassi livelli di interazione non-specifica
- Modificabili per essere specifiche



Figure 5. Schematic presentation of different matrix types (a) non-porous beads (b) microporous beads (c) macroporous beads

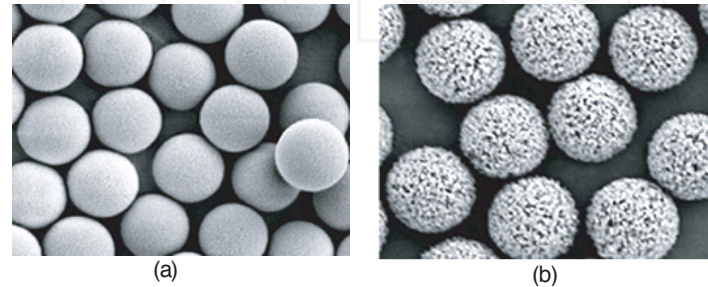


Figure 6. (a) Non-porous beads (b) Porous beads

CAPACITA': quantità di gruppi carichi o potenzialmente carichi presenti per unità di peso di resina secca.

mEq di gruppi ionizzabili/mg di resina

Fase mobile:

soluzione contenente ioni in grado di competere con gli ioni presenti nel campione

NaCl è il più usato in assoluto

..ma non sempre risulta la scelta migliore

La scelta è basata:

sulla specificità con cui scambia sulla resina

sulla sua concentrazione

dal flusso della fase mobile

IMPORTANTE

De-gasare la fase mobile: la CO_2 da origine a acido carbonico

L'eluizione può essere **ISOCRATICA** O A **GRADIENTE**

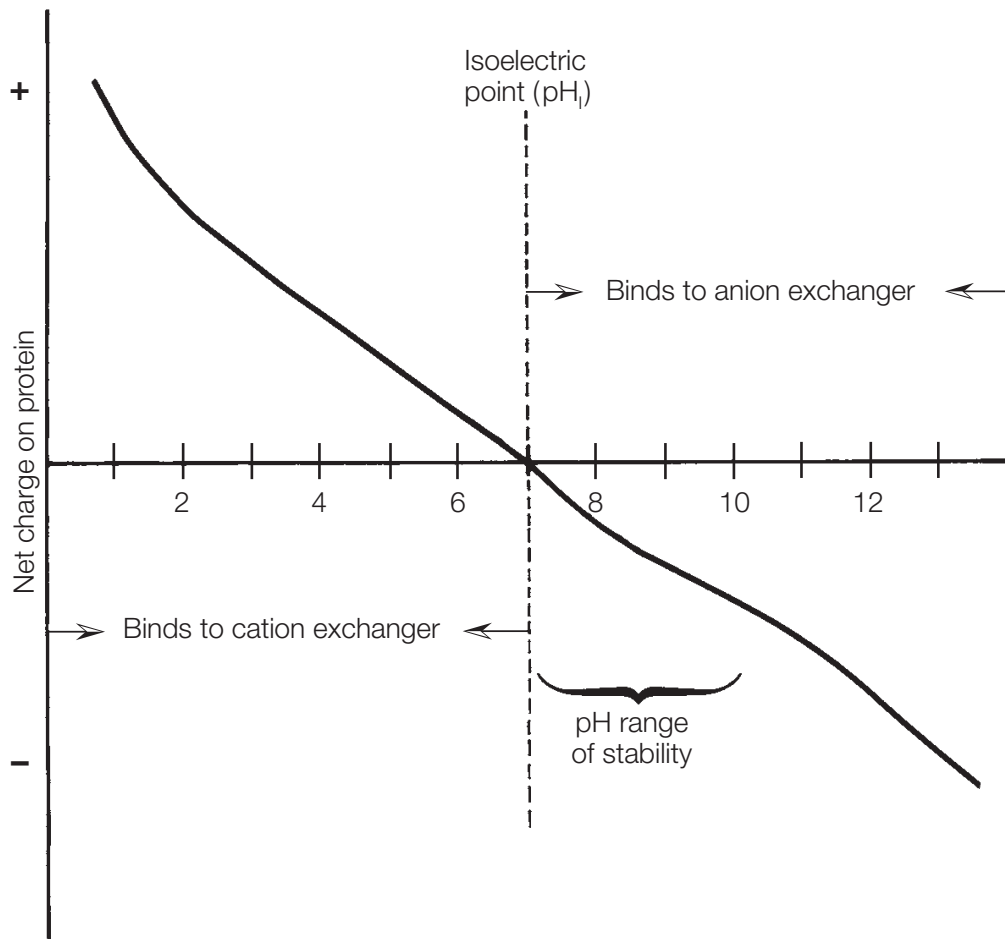
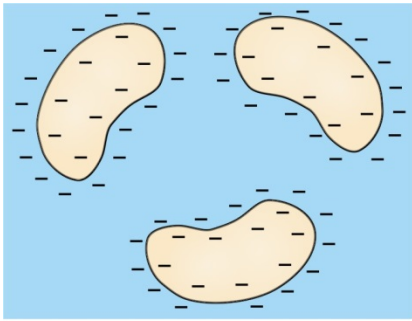
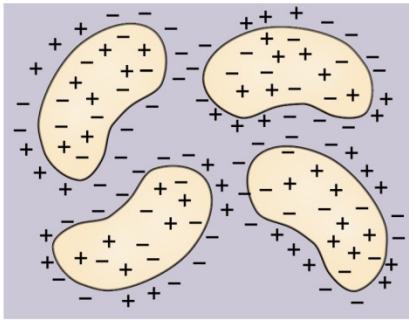


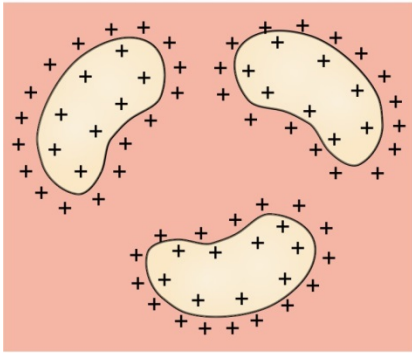
FIGURE 5.6 The effect of pH on the net charge of a protein.



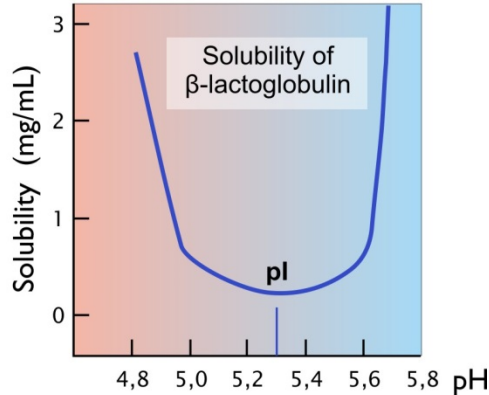
a) At pH values above the isoelectric point the protein is negatively charged



b) $\text{pH}=\text{pI}$, the number of negative and positive charges is equal



c) At pH values below the isoelectric point the protein is positively charged

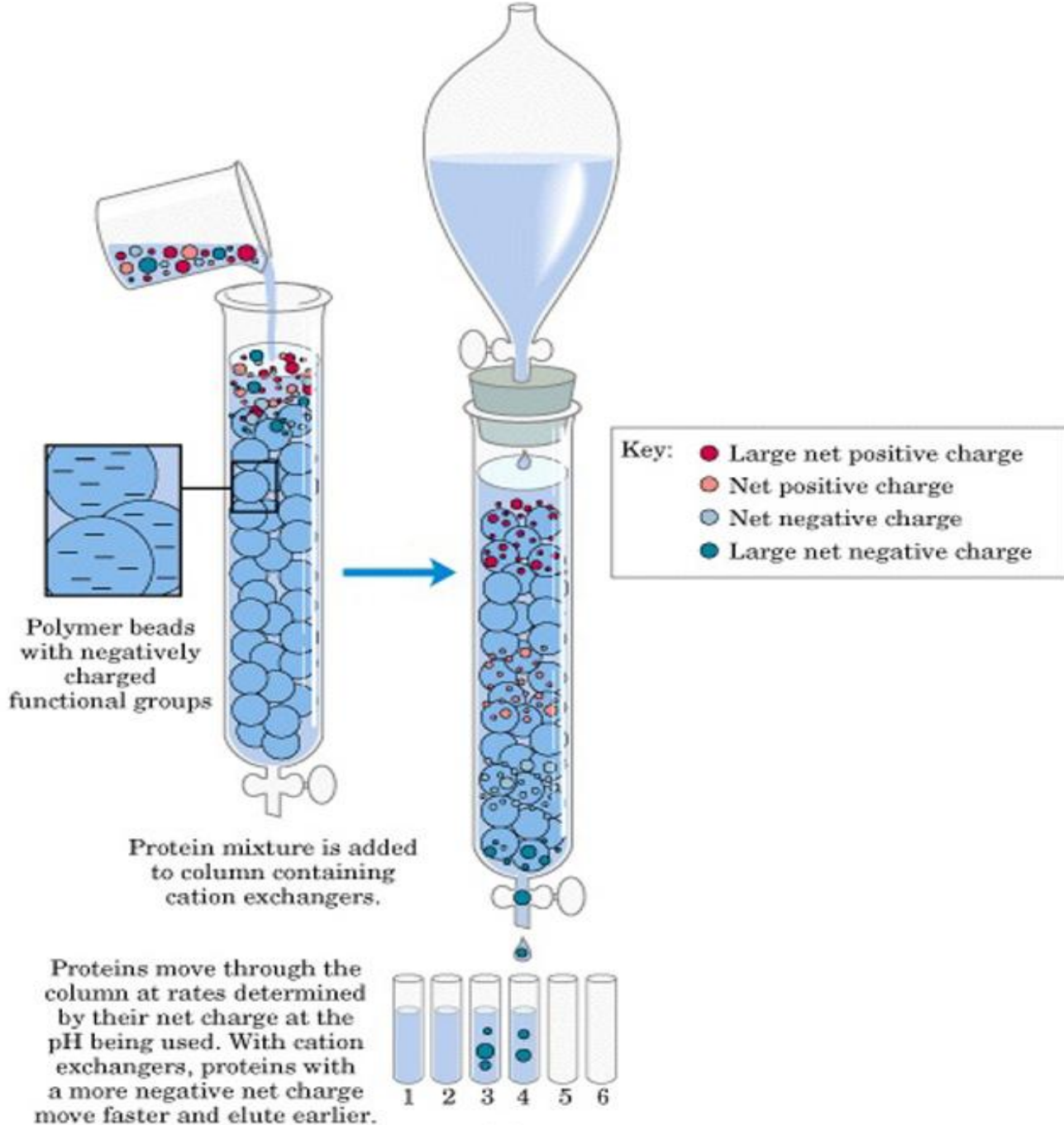


d) pH-dependence of the solubility of the β -lactoglobulin protein

| Resin Type | Cation Exchanger | Anion Exchanger |
|------------------------------------|--|--|
| Net Charge of Molecule of Interest | + | - |
| Charge of Resin | - | + |
| Running Conditions | Run at 0.5–1.5 pH units below the pI of the molecule of interest | Run at 0.5–1.5 pH units above the pI of the molecule of interest |

**TABLE 5.3 Ion-Exchange Resins**

| Name | Functional Group | Matrix | Class |
|--------------------------|--|-------------|--------------|
| Anion Exchangers | | | |
| AG 1 | Tetramethylammonium | Polystyrene | Strong |
| AG 3 | Tertiary amine | Polystyrene | Weak |
| DEAE-Sephacel | Diethylaminoethyl | Sephacel | Weak |
| PEI-cellulose | Polyethyleneimine | Cellulose | Weak |
| DEAE-Sephadex | Diethylaminoethyl | Dextran | Weak |
| QAE-Sephadex | Diethyl-(2-hydroxyl-propyl)-aminoethyl | Dextran | Strong |
| DEAE-Sepharose | Diethylaminoethyl | Agarose | Weak |
| Cation Exchangers | | | |
| AG 50 | Sulfonic acid | Polystyrene | Strong |
| Bio-Rex 70 | Carboxylic acid | Acrylic | Weak |
| CM-Sephacel | Carboxymethyl | Sephacel | Weak |
| P-Cellulose | Phosphate | Cellulose | Intermediate |
| CM-Sephadex | Carboxymethyl | Dextran | Weak |
| SP-Sephadex | Sulfopropyl | Dextran | Strong |
| CM-Sepharose | Carboxymethyl | Agarose | Weak |
| SP-Sepharose | Sulfonic acid | Agarose | Strong |



(a)

SELETTIVITA' in funzione del pH:

L'optimum di selettività si ottiene normalmente a valori di pH per i quali sia massima la differenza tra le curve di titolazione (**maggiore differenza in carica netta**) e utilizzando uno scambiatore di ioni con una carica opposta alla carica della proteina a quel particolare pH

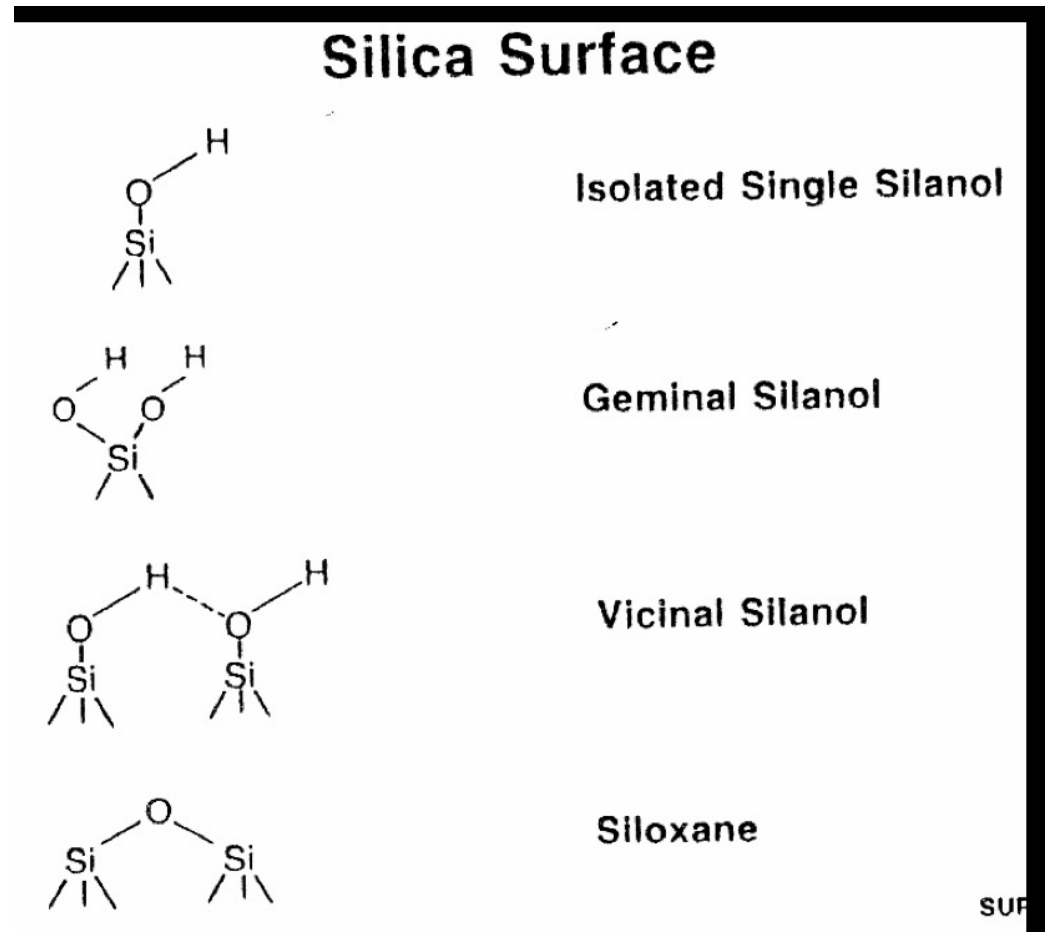
Talvolta la curva di titolazione di una proteina non è totalmente predittiva sul comportamento della proteina: il pI è dato dalla carica netta totale, la cromatografia a scambio ionico è basata solo sulla presenza della carica netta superficiale!!!

Un tipico adsorbente è la **silice**

- Particle size 2-100 μ m
- Pore size 60-4000Å
- Surface area 1-500m²/g
- pH 2-7.5

Leggermente acida, può interagire con gruppi polari dell'analita o dell'eluente.

Le proprietà di separazione dipendono dalla disposizione dei gruppi di silanolo



Altre resine utilizzate sono **l'allumina (Al₂O₃)**, e il **carbone**

Nella fase diretta

Fase stazionaria: polare

Fase mobile: solvente organico o miscela meno polare (*i solventi più polari hanno maggiore forza eluente*)

Adatta per separare analiti con scarsa solubilità in solventi acquosi.

Cosa viene eluito per primo?

Gli analiti meno polari

Nella fase inversa

Fase stazionaria: apolare

Fase mobile: più polare (*i solventi meno polari hanno maggiore forza eluente*)

Cosa viene eluito per primo?

Gli analiti polari eluiscono per primi.

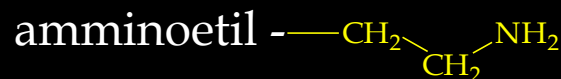
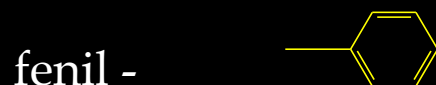
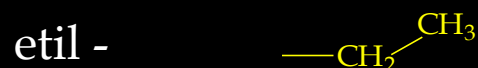
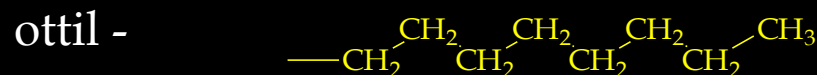
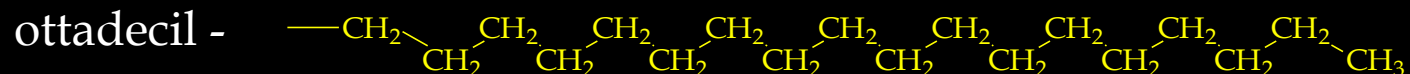
L'eluizione può richiedere un gradiente con proporzioni crescenti di solvente a bassa polarità.

Tabella 3-2: Gruppi funzionali interessati dalla cromatografia di adsorbimento in ordine di polarità crescente.

| Gruppo funzionale | Struttura |
|-------------------|---|
| Metile | - CH ₃ |
| Fluoro | - F |
| Cloro | - Cl |
| Nitro | - NO ₂ |
| Aldeide | - CHO |
| Acetile | - O - $\overset{\text{O}}{\parallel}$ C - CH ₃ |
| Ossidrile | - OH |
| Chetone | - $\overset{\text{O}}{\parallel}$ C - |
| Ammina | - NH ₂ |
| Carbossile | - COOH |
| Ammide | - NH - $\overset{\text{O}}{\parallel}$ C - |

Sostituenti utilizzati per modificare la fase stazionaria

I gruppi legati alla silice che più frequentemente vengono utilizzati sono:



A FASE DIRETTA

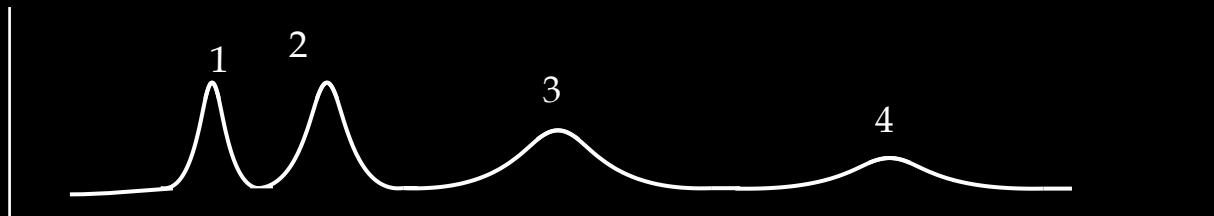
POLARITÀ

ELUIZIONE può essere ISOCRATICA

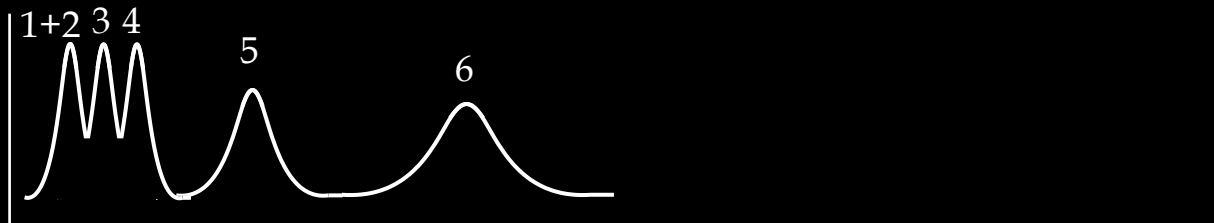
ELUIZIONE può essere in GRADIENTE

EFFETTI DELLA FORZA DEL SOLVENTE SULLA SEPARAZIONE

SOLVENTE DEBOLE



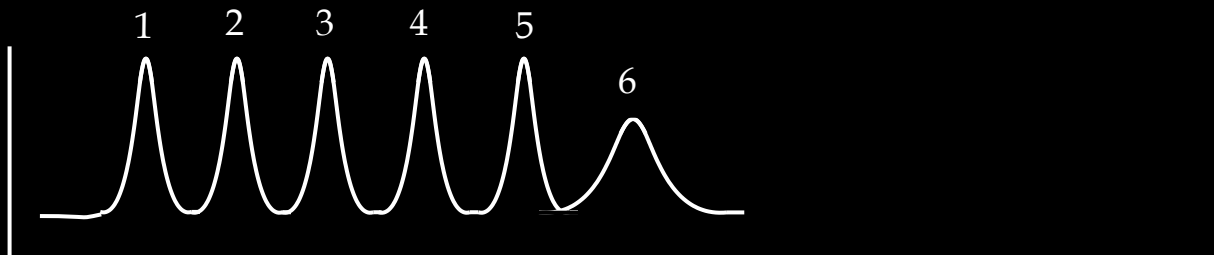
SOLVENTE FORTE



SOLVENTE INTERMEDIO



GRADIENTE DI SOLVENTE



Tipologia sulla base di...

HPLC (high pressure liquid chromatography)

E' uno strumento analitico derivato dalla cromatografia classica e si basa sugli stessi principi.

La forza che permette all'eluente di scorrere nella colonna, è rappresentata dalla **pressione** che è applicata da una pompa in testa alla colonna e che forza la fase mobile a scorrere all'interno della fase stazionaria

Processo più rapido ma permette anche di ottenere un maggior numero di piatti teorici il che vuol dire una **migliore risoluzione.**

Sono richieste pressioni di pompaggio di diverse **centinaia di atmosfere**

Parametri da considerare per valutare una separazione cromatografica:

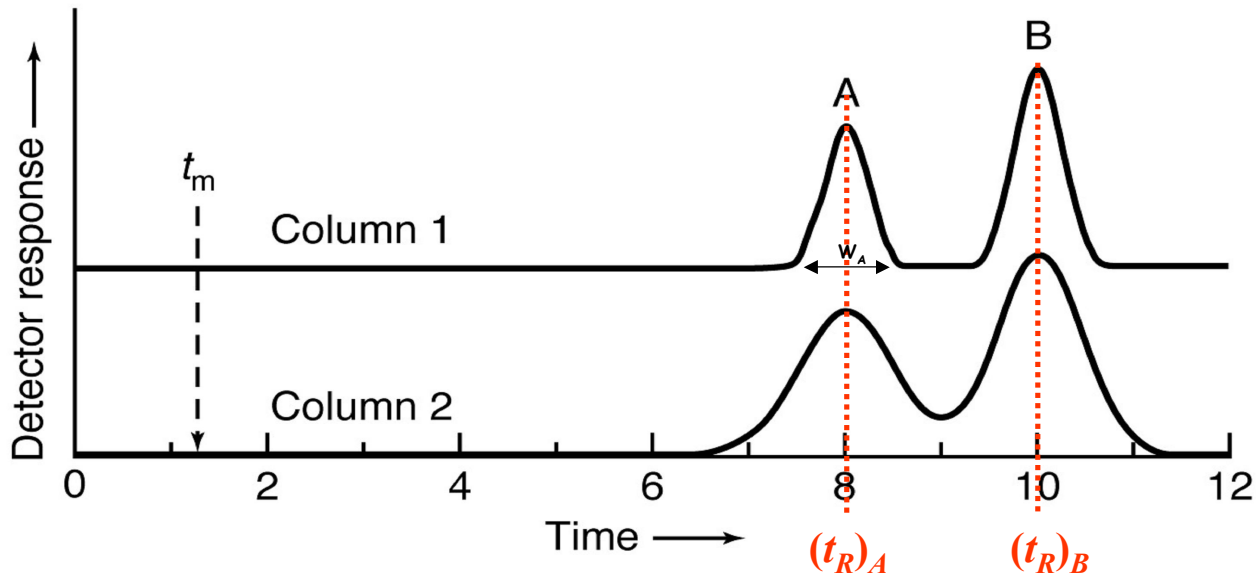
RISOLUZIONE di una COLONNA (efficienza e selettività)

La risoluzione, R , è una misura quantitativa della capacità di separare due analiti.

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

$W = 4\sigma$

$R > 1,5$



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

$$\alpha = \frac{t_{R1} t_M}{t_{R2} t_M} = \frac{t'_{R1}}{t'_{R2}}$$

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

R è influenzata da:

Efficienza della colonna

Selettività

Fattore di capacità

$$R = \frac{\sqrt{N}}{4} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k'_2}{1 + k_{av}} \right)$$

k'_2 = capacità del picco
maggiormente trattenuto

k_{av} = media delle capacità dei due
analiti

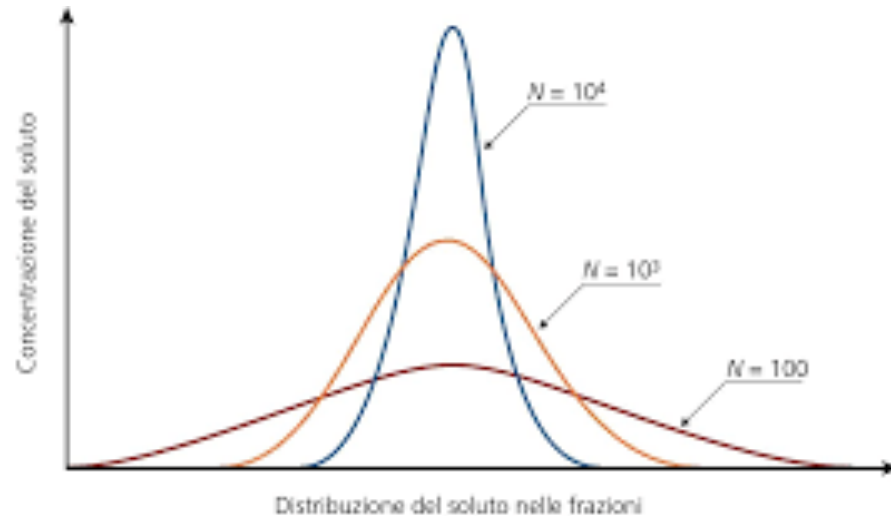


Figura 5.7
Esempi di distribuzioni diverse di una molecola che è uscita dalla colonna ed è stata raccolta in frazioni. L'efficienza della colonna, ossia la larghezza del picco, dipende, come spiegato nel testo, dal numero di piatti teorici (N).

Tali caratteristiche sono espresse dall'equazione di van Deemter:

Da indicazione del rapporto tra altezza del piatto teorico (HEPT) e velocità di flusso

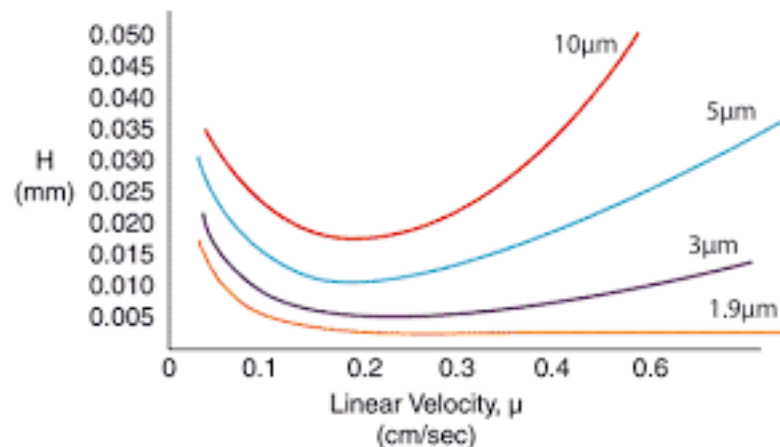
$$H_{EPT} = A + B/u + Cu$$

A = diffusione legata all'impaccamento della colonna

B = dispersione delle molecole eluite lungo il percorso

C = resistenza al trasferimento dell'analita dalla fase mobile alla stazionaria
Resistance to mass transfer coefficient of the analyte between mobile and stationary phase [s]

u = velocità lineare di flusso



- Con una colonna di 25 cm, ID 4 mm e fase stazionaria di 5 μ m, per ottenere un flusso di n-esano di 1mL/min è necessaria una pressione in ingresso di 70 atm
- Ma esistono colonne di 3 cm con ID>1mm e con granulometria di 3 μ m.

Lunghezza: 10-30 cm

Diametri interni: 2-5 mm

Impaccamenti di particelle: 3-10 μm

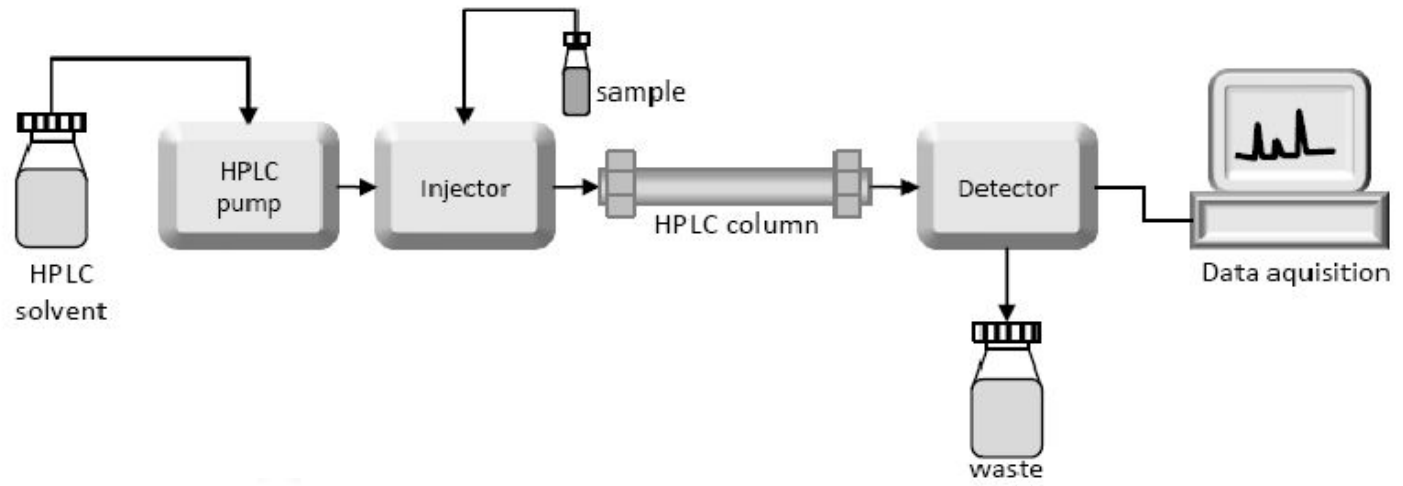
N: 40 000-60 000 piatti teorici per metro

Lunghezza: 3-7,5 cm

Diametri interni: 1-4,6 mm

Impaccamenti di particelle: 3-5 μm

N: fino 100 000 piatti teorici per metro



CARATTERISTICHE DEI RILEVATORI

- Sensibilità adeguata al problema
- Buona stabilità e riproducibilità
- Risposta lineare al soluto, possibilmente per parecchi ordini di grandezza
- Tempi di risposta rapidi
- Risposta verso tutti i soluti, oppure risposta selettiva verso una o più classi di soluti

| Rivelatore | LOD (ng) | Selettività | Utilizzabile in gradiente? |
|-----------------------|-----------------|--------------------|-----------------------------------|
| Assorbimento UV | 0.1-1 | selettivo | SI |
| Indice di rifrazione | 100-1000 | generale | NO |
| Fluorescenza | 0.001-0.01 | selettivo | SI |
| Elettrochimico | 0.01-1 | selettivo | NO |
| Conduttimetrico | 0.5-1 | selettivo | NO |
| Assorbimento IR | 1000 | selettivo | SI |
| Spettrometro di massa | 0.0001-1 | generale | SI |

GAS CROMATOGRAFIA

- Gas-liquido
 - supporto inerte solido
 - liquido non volatile, legato covalentemente
 - meccanismo di ripartizione
 - moltissime applicazioni

- Gas-solido
 - fasi stazionarie di silice, allumina o carbone
 - meccanismo di adsorbimento
 - adatta per la separazione di gas permanenti (H_2 , He, Ar, O_2 , N_2 , CO) o idrocarburi a basso punto di ebollizione

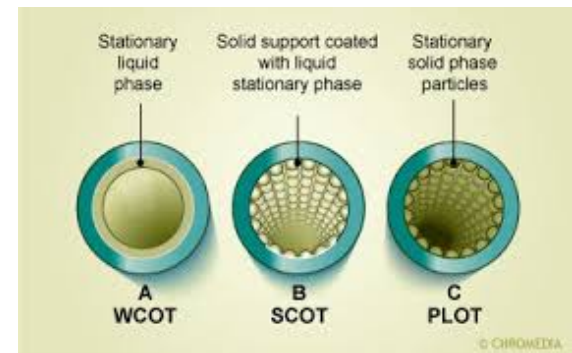
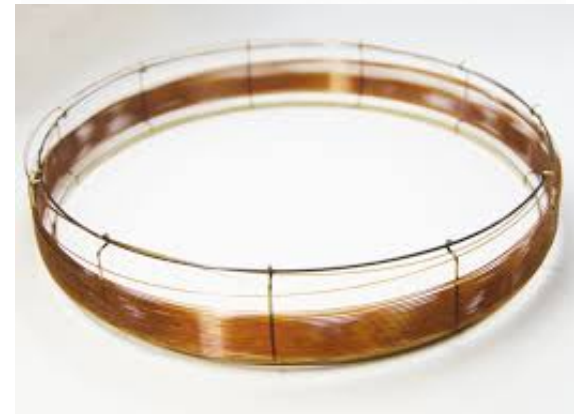
Colonne per gascromatografia

Colonne impaccate

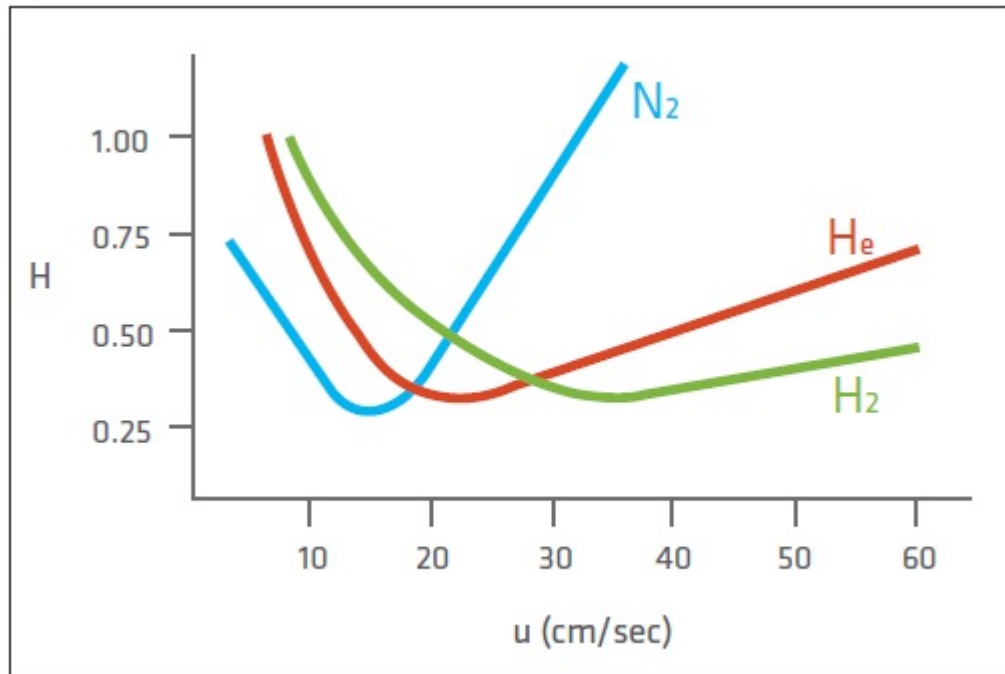
– contengono un supporto solido inerte, finemente suddiviso (comunemente basato su terra di diatomee), ricoperto di fase stazionaria liquida

Colonne capillari

– WCOT (Wall Coated Open Tubular), strato sottile di fase liquida (1 μm) depositato sulla superficie
– SCOT (Support Coated Open Tubular), strato poroso creato sulle pareti della colonna per trattamento o deposizione chimica
– PLOT (Porous Layer Open Tubular), strato poroso polimerico o inorganico che funge da fase stazionaria per una cromatografia di adsorbimento



CARRIER GAS



I gas devono essere INERTI
SECCHI e PRIVI di IMPUREZZE

Solamente il 23% delle sostanze può essere separato per GC

Rilevatori per GC

- a conducibilità termica (TCD)
- a ionizzazione di fiamma (FID)
- a cattura di elettroni (ECD)
- a conducibilità elettrolitica (ELCD)
- amperometrico per lo zolfo (ASD)
- termoionico (TID o NPD)
- fotometrico a fiamma (FPD)
- a fotoionizzazione (PID)
- ad emissione atomica (AED)
- a chemiluminescenza
- spettrometria di massa (MS)

La selezione è basata su:

- natura chimica degli analiti
- potenziali interferenze
- limite di rivelabilità richiesto (LOD)
- disponibilità e/o costo