

Bibliografia

- Snyder L.R., Kirkland J.J. *Introduction to Modern Liquid Chromatography*. 2nd Ed. Wiley Interscience, New York, 1979.
- Ugo R. *Analisi Chimica Strumentale*. L'Editrice Scientifica, L.G. Guadagni, Milano, 1980.
- Goretti C.G. *Cromatografia*. Euroma, 1986.
- Bauer H.H., Christian C.D., O' Reilly, J.E. *Analisi Strumentale*. Piccin, 1985.
- Bucarelli F.M., Sagone F.R., Signorini C. *Cromatografia Supercritica. Applicazione in campo elementare*. Nuova Cultura, 1996.
- Scott R.P.W. *Modern Liquid Chromatography*. Chem. Soc. Rev. 1992, 137-145.

3.2 LA CROMATOLOGRAFIA DI ADSORBIMENTO

Maria Rosaria Iesce

Introduzione

La cromatografia di adsorbimento rappresenta uno dei metodi più antichi e più usati per la separazione di composti organici. È detta anche cromatografia liquido-solido in quanto al processo separativo prendono parte un liquido, che costituisce la fase mobile, e un solido attivo finemente suddiviso, che funge da fase stazionaria. Il solido è detto anche adsorbente mentre il solvente della fase mobile è detto eluente. 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.

Generalmente la cromatografia di adsorbimento viene effettuata in due modalità distinte: su colonna e su strato sottile. Nella cromatografia di adsorbimento su colonna il processo separativo avviene in una colonna di vetro dotata nella parte inferiore di un rubinetto, all'interno della quale è introdotto l'adsorbente: la miscela da separare è solubilizzata nella minima quantità di un opportuno solvente ed è applicata alla sommità dell'adsorbente. La separazione si effettua facendo fluire per gravità la fase mobile nella colonna. I vari componenti della miscela sono sottoposti ad una serie continua di processi di adsorbimento-deadsorbimento e si muovono con velocità diverse secondo l'affinità per la fase stazionaria, dando luogo a varie bande (in funzione del numero di componenti e della efficacia della separazione) che possono essere raccolte individualmente.

Nella cromatografia su strato sottile (Thin Layer Chromatography, TLC) la fase stazionaria è depositata sotto forma di uno strato sottile su un supporto inerte (es. vetro) e la fase mobile viene fatta salire dal basso verso l'alto per capillarità. In genere si ricorre alla cromatografia su colonna per effettuare separazioni su scala preparativa, mentre la TLC è per lo più utilizzata per scopi analitici.

Principi generali

Come accennato in precedenza, il fenomeno dell'adsorbimento nella cromatografia liquido-solido dipende dalla particolare affinità di un soluto disciolto in una fase liquida nei confronti di una fase solida (adsorbente) a contatto con quest'ultima. Poiché il processo di adsorbimento avviene sulla superficie dell'adsorbente, la sua efficacia è direttamente proporzionale all'estensione superficiale dell'adsorbente a parità di volume [Nota: L'adsorbimento non va confuso con l'assorbimento (o assorbimento), che comporta invece la penetrazione di una sostanza in un'altra e interessa pertanto l'intero volume della sostanza adsorbente e non solo la sua superficie].

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, nonché 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. Poiché il materiale di cui è costituito l'adsorbente è relativamente polare (allumina, silice), quanto più è polare il gruppo funzionale tanto maggiore è la forza con cui la sostanza viene adsorbita sulla fase stazionaria. L'affinità relativa delle varie classi di composti organici nei confronti di fasi stazionarie 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. Così, 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. La dimensione molecolare e la natura dell'eluente sono altri fattori che possono influenzare l'affinità relativa di due o più specie per la fase stazionaria.

Si può constatare sperimentalmente che le separazioni cromatografiche sono tanto più efficaci quanto più sono bassi i quantitativi di soluti da separare. Ciò è confermato dall'espressione più semplice dell'equazione di Langmuir:

$$q = a c / (1 + bc)$$

dove q è l'adsorbimento specifico di una sostanza; c la sua concentrazione d'equilibrio; a e b due costanti. A parità di ogni altra condizione, a bassissime concentrazioni, il denominatore $1 + b \cdot c$ dell'equazione può considerarsi praticamente uguale a 1: l'equazione diventa allora $q = ac$, che è l'equazione di una retta. Pertanto l'adsorbimento q diventa il massimo possibile.

Le fasi stazionarie (adsorbenti)

Le caratteristiche che deve possedere una fase stazionaria (adsorbente) ideale sono:

- non reagire con il soluto né catalizzare reazioni di decomposizione, polimerizzazione, idrolisi;
- non adsorbire irreversibilmente il soluto;
- non solubilizzarsi nell'eluente né interagire con questo;
- riuscire ad adsorbire un gran numero di sostanze in maniera selettiva e riproducibile, senza dar luogo a fenomeni di saturazione;
- permettere un facile percolamento dell'eluente.

Non esiste un materiale che possenga tutte queste proprietà, per cui la scelta dell'adsorbente viene fatta attraverso un compromesso tra le varie caratteristiche.

L'attività (potere adsorbente) di un adsorbente può essere definita in base alla quantità di calore che esso libera quando lo si pone a contatto con un determinato solvente. A parità d'ogni altra condizione, il potere adsorbente di una fase stazionaria dipende dalla quantità di acqua libera ad esso legata, ovvero dalla quantità di acqua che può venire eliminata reversibilmente per riscaldamento senza che la struttura dell'adsorbente stesso ne risulti modificata. L'acqua è uno dei principali agenti disattivanti di fasi stazionarie adsorbenti.

Tabella 3.2.1 Classificazione delle fasi stazionarie più comuni secondo il potere adsorbente.

Forte	Medio	Debole
Allumina	Idrossido di Calcio	Cellulosa
Carbone attivo	Idrossido di Magnesio	Talco
Florisil	Fosfato di Calcio	Amido
Gel di silice	Carbonato di Calcio	Saccarosio

I più comuni materiali usati come fasi stazionarie sono riportati in Tabella 3.2.1 secondo un ordine decrescente del potere adsorbente.

Gli adsorbenti che più si avvicinano alle caratteristiche ideali, e che sono quindi più utilizzati, sono la silice e l'allumina. L'allumina è l'ossido di alluminio (Al_2O_3) ed ha un alto potere adsorbente. È commercialmente disponibile in tre forme, acida, basica e neutra, e permette di separare composti con differenti caratteristiche di acidità e basicità. Il potere adsorbente (attività) può essere variato aggiungendo acqua. Il grado di attività (scala di Brockmann) è definito in funzione della quantità di acqua adsorbita (Tabella 3.2.2).

La disattivazione va effettuata aggiungendo la necessaria quantità di acqua all'allumina opportunamente seccata in una beuta tappata e scuotendo fino ad ottenere una massa uniforme e perfettamente asciutta. Il processo è fortemente esotermico per cui può essere necessario raffreddare esternamente la beuta prima di utilizzare il solido. L'alto potere adsorbente dell'allumina ne limita l'uso alla separazione di prodotti a bassa e media polarità: quelli molto polari, es. acidi carbossilici, potrebbero essere adsorbiti irreversibilmente. Inoltre l'allumina è altamente reattiva e in grado di catalizzare reazioni di decomposizione e di condensazione, ad es. di aldeidi e chetoni.

Il gel di silice e il florisil hanno minor potere adsorbente dell'allumina e possono essere ulteriormente disattivati per aggiunta di acqua. Sono utilizzabili per la separazione di una vasta varietà di composti organici, tra cui alcoli, esteri, composti carbonilici, ammine, ecc.

Altri adsorbenti utilizzati per la separazione di composti organici sono il carbone attivo, il carbonato di calcio, il silicato di magnesio, l'amido, il saccarosio, ecc. Questi ultimi sono particolarmente indicati per la separazione di sostanze naturali sensibili ad interazioni acido-base o sostanze molto polari che sarebbero fortemente adsorbite da allumina o silice.

Poiché l'adsorbimento è un fenomeno superficiale, è importante che la fase stazionaria abbia:

Tabella 3.2.2 Attività dell'allumina secondo Brockmann e percentuale di acqua.

Attività	Percentuale di acqua (in peso)
I	0
II	3-4
III	5-7
IV	8-11
V	12-19

- a) una elevata estensione superficiale che favorisca il rapido instaurarsi dell'equilibrio tra la fase stazionaria e quella mobile;
- b) particelle con granulometria uniforme (monodispersa), al fine di rendere più efficaci i fenomeni di adsorbimento.

La granulometria è espressa oltre che dalla dimensione delle particelle (es. 0,2-0,3 mm) anche in termini di intervalli di mesh, unità di derivazione anglosassone che rappresenta il numero di fori per pollice lineare (2,54 cm) di un setaccio: ad es. un setaccio da 70 mesh contiene per ogni pollice lineare 70 fori. Una granulometria caratterizzata dall'intervallo 70-230 mesh sta ad indicare che i granuli possono attraversare completamente un setaccio da 70 mesh e sono totalmente trattenuti da un setaccio da 230 mesh. Più stretto è l'intervallo di mesh, più efficace è il processo separativo.

Le fasi mobili e la serie eluotropica

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, di seguito riportata (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.

È possibile utilizzare tali solventi in miscele di varia composizione, così da realizzare fasi mobili con potere eluente variabile. L'eluizione in tal caso può essere a stadi o a gradiente di potere eluente.

I solventi da utilizzare come eluenti devono soddisfare requisiti essenziali di purezza e anidrità: piccole quantità di impurezze possono sensibilmente influenzare il potere eluente e modificare le caratteristiche adsorbenti della fase stazionaria (es. l'acqua).

Le caratteristiche principali di un eluente sono:

- non deve reagire né con l'adsorbente né con i prodotti da separare;
- non deve solubilizzare l'adsorbente;
- deve far migrare i componenti della miscela da separare;
- deve avere un basso punto di ebollizione così da permettere un facile recupero dei soluti per svaporazione;
- non deve essere tossico né molto costoso.

In genere non si utilizza, ad esempio, acetone se la fase stazionaria è allumina, in quanto questa ne catalizza la reazione di condensazione, né è consigliabile eluire con metanolo una colonna di gel di silice, con cui l'alcol reagisce per dare silicati solubili.

In una separazione cromatografica la scelta del solvente è effettuata su basi empiriche con vari tentativi. Le prove preliminari sono preferibilmente condotte utilizzando la TLC, che richiede quantità estremamente piccole di campione e tempi di esecuzione molto rapidi.

Cromatografia su strato sottile (TLC)

Nella cromatografia su strato sottile (TLC), detta anche cromatografia laminare, la fase stazionaria è costituita da un sottile strato di adsorbente. Questo viene mescolato con un opportuno legante quale gesso, amido solubile ecc. (che ha lo scopo di conferire al materiale adsorbente particolare compattezza) e talvolta anche con sostanze fluorescenti come rivelatori (vedi avanti), ed è fatto aderire su di una lastra di vetro, di alluminio o poliestere. Il campione viene caricato su un punto o una linea stretta della fase stazionaria e viene eluito dalla fase mobile che sale lungo la lastra cromatografica (cromatografia ascendente) per effetto della capillarità.

La TLC permette di analizzare piccole quantità di prodotto (1-3 mg in 0,5 mL di solvente) e rappresenta uno dei metodi analitici più semplici e diffusi in chimica organica: è adoperata per la ricerca della migliore combinazione adsorbente/eluente in previsione di una separazione cromatografica su colonna; per seguire l'andamento di una separazione cromatografica su colonna; per seguire lo svolgimento di una reazione (scomparsa del/i reagente/i e/o comparsa del/i prodotto/i); per il controllo della purezza di un composto; per il riconoscimento di prodotti incogniti.

Sviluppo della lastra e determinazione del fattore R_f

Per effettuare una TLC si applica in un punto predefinito della lastra cromatografica (a circa 7-8 mm dal fondo) una goccia della soluzione della miscela da separare mediante un capillare di vetro. La deposizione va fatta toccando col capillare lo strato di adsorbente facendo attenzione a non far slargare eccessivamente la zona di caricamento (diametro = 1-2 mm). Se la soluzione è diluita o si vuole caricare più sostanza, si può ripetere il caricamento più volte sullo stesso punto. Per evitare di avere macchie di dimensioni troppo grandi, si svapora il solvente con un getto d'aria (calda o fredda a seconda della stabilità dei composti) prima di ogni successiva aggiunta. La lastra è posta quindi in una camera di sviluppo, ovvero un contenitore chiuso sul fondo del quale vi è la fase mobile. È importante che la zona di caricamento sia sempre al di sopra del livello del solvente. Durante l'eluizione, i vari componenti della miscela migrano con velocità diverse e si separano lungo il percorso del solvente (Figura 3.2.1). Quando il fronte del solvente è arrivato a pochi mm dalla sommità della lastra, si estrae la lastra dalla camera, si segna la posizione del fronte del solvente, si asciuga e si evidenziano i vari componenti separati durante il processo cromatografico.

Come accennato sopra, l'ascesa del solvente deve essere interrotta prima che il fronte raggiunga il bordo superiore. Ciò permette di determinare il fattore di ritenzione (R_f) che è dato dal rapporto tra la distanza percorsa dalla sostanza (A) e quella percorsa dal solvente (S): $R_f = A/S$ (Figura 3.2.2).

Il valore di R_f è compreso tra 0 (il composto non è migrato ed è rimasto al punto di caricamento) e 1 (il composto non è trattenuto per nulla dall'adsorbente e migra con il fronte dell'eluente) e si calcola fino alla seconda cifra decimale. È costante per ogni sistema cromatografico ed è una caratteristica della sostanza esaminata. La determinazione dell' R_f può pertanto essere adoperata per il riconoscimento di una sostanza incognita. In pratica, tuttavia, l' R_f dipende da diversi fattori sperimentale (dimensioni delle particelle di fase stazionaria, stato di conservazione della lastra, composizione dell'eluente, grado di saturazione della camera) e può variare leggermente da un'analisi all'altra. Pertanto, può essere opportuno, per identificare un composto in confronto con un campione di riferimento, effettuare una analisi TLC caricando su un'unica lastra in tre punti il composto da identificare, il

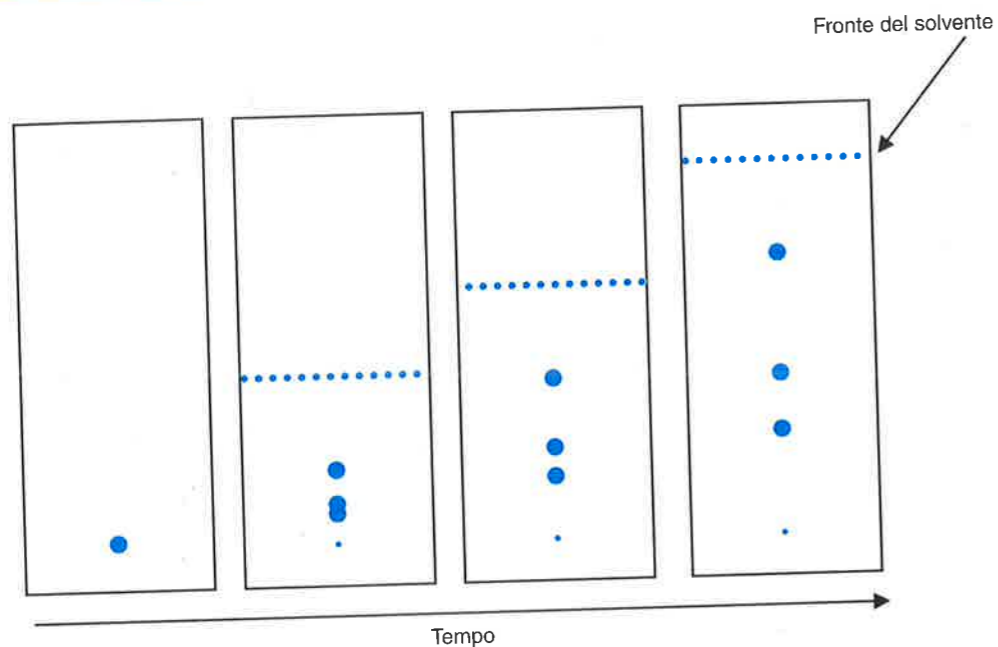


Figura 3.2.1 Rappresentazione schematica di una separazione cromatografica mediante TLC.

campione di riferimento e una miscela dei due (caricati in sequenza sullo stesso punto). Il perfetto allineamento delle tre macchie o bande dopo sviluppo e l'omogeneità della macchia o banda (assenza di separazione) nella miscela dei due composti confermerà la loro identità. Nonostante l' R_f sia caratteristico di ogni sostanza, composti diversi possono casualmente avere lo stesso valore di R_f in una determinata separazione cromatografica. Pertanto è consigliabile effettuare più analisi con eluenti e fasi stazionarie diverse per confermare l'identità tra due prodotti.

Le camere di sviluppo

Sono utilizzate vaschette di varia forma e dimensione chiuse da un coperchio. Per lastre singole di piccola dimensione (<5 cm di larghezza) si usano vasche

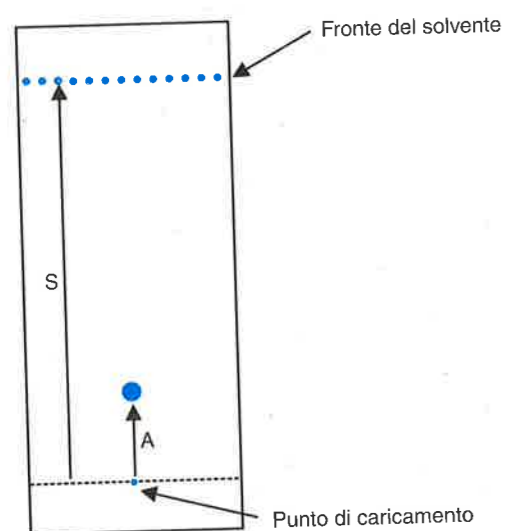


Figura 3.2.2 Determinazione dell' R_f .

piccole cilindriche. Esistono inoltre vasche a base rettangolare di dimensioni tali da poter contenere più lastre di 20×20 cm, con pareti provviste di scanalature verticali entro le quali si inseriscono le estremità delle lastre. Queste ultime vasche sono utilizzate per sviluppi simultanei.

È importante fare attenzione all'atmosfera della camera cromatografica in quanto la fase di vapore può influenzare la regolarità della separazione. Per ottenere migrazioni riproducibili è consigliabile saturare la camera con il vapore del solvente: per facilitare la sua diffusione nello spazio si rivestono le pareti della camera con carta da filtro immersa nell'eluente lasciando un lato scoperto per poter osservare la lastra durante l'eluizione.

Rivelazione

Se i componenti, che sono stati separati mediante TLC, non sono direttamente visibili bisogna ricorrere ad opportuni metodi di rivelazione. I metodi più comunemente usati sono i seguenti:

- 1) Si espone la lastra asciutta ad una lampada ultravioletta (UV, lunghezza d'onda 254 o 366 nm) per evidenziare le sostanze fluorescenti e i composti che contengono gruppi funzionali in grado di assorbire all'UV quali sistemi aromatici, coniugati, ecc. (Capitolo 4.3). Questo sistema di rivelazione viene facilitato utilizzando lastre in cui l'adsorbente è impregnato con indicatori di fluorescenza. Per esposizione alle radiazioni UV la lastra mostrerà intensa fluorescenza tranne che nelle zone dove sono presenti sostanze che assorbono nell'UV: in tali zone la radiazione non riesce a raggiungere l'indicatore e non si osserverà fluorescenza ma una banda o macchia scura;
- 2) un metodo universale, che però può essere applicato solo su lastre in cui sia il supporto che l'adsorbente siano di materiale inorganico, consiste nello spruzzare la lastra con soluzioni di acido solforico concentrato, da solo o insieme ad acido nitrico o bicromato di potassio. La lastra va quindi posta in stufa e riscaldata a $110-120^\circ\text{C}$. In questa maniera tutte le sostanze organiche saranno ossidate e carbonizzate per dare macchie o bande scure;
- 3) composti organici che posseggono almeno un legame insaturo (es. doppio legame carbonio-carbonio) formano complessi scuri a trasferimento di carica in presenza di vapori di iodio. Per rivelare tali composti si asciuga accuratamente la lastra dopo lo sviluppo e la si pone in un recipiente chiuso sul fondo del quale sono posti dei cristalli di iodio (nota: evitare di aspirare i vapori di iodio). Dopo qualche minuto si osserva formazione del complesso bruno in corrispondenza delle zone dove sono migrate le sostanze insature. Per esposizione all'aria il complesso si decompone e lentamente le macchie o bande scompaiono. Tale sistema di rivelazione può anche essere applicato utilizzando soluzioni di iodio in metanolo o etanolo da spruzzare sulla lastra.
- 4) esiste infine un numero elevato di reattivi (reattivi cromogeni) che danno luogo a prodotti colorati per reazione selettiva con determinati gruppi funzionali. Questi reattivi vanno scelti in funzione della natura chimica dei composti da rivelare.

Se non si conosce la natura dei prodotti da analizzare o se il miscuglio è costituito da prodotti molto diversi possono essere utilizzati più sistemi di rivelazione, sia sulla stessa lastra, qualora ciò sia possibile, o su più lastre sviluppate in maniera identica.

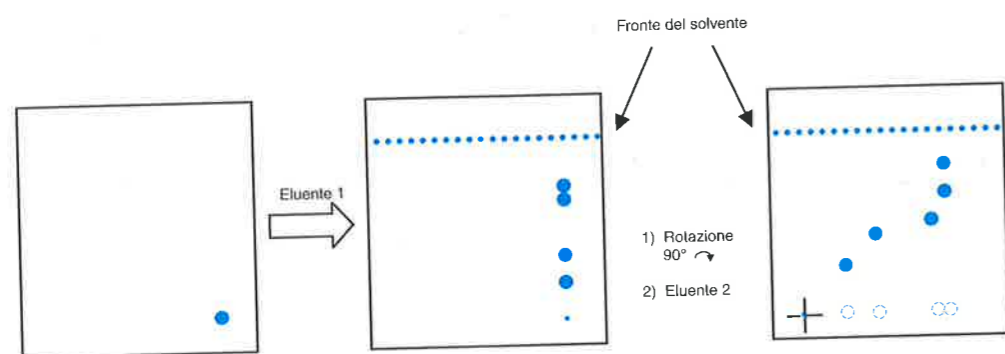


Figura 3.2.3 Sequenza di operazioni in una TLC bidimensionale.

TLC bidimensionale

In alcuni casi, soprattutto in presenza di miscele molto complesse, si può far ricorso a tecniche bidimensionali di separazione su strato sottile (TLC bidimensionale) in cui il campione viene depositato in un angolo di una lastra quadrata. La separazione cromatografica viene effettuata con una opportuna miscela eluente. Al termine si asciuga la lastra, la si ruota di 90° e la si sviluppa con una seconda miscela con differente potere eluente (Figura 3.2.3). In questo modo composti che non si separano con la prima miscela eluente possono essere separati con la seconda.

TLC preparativa

La cromatografia TLC può essere adoperata anche a scopi preparativi, utilizzando lastre di dimensioni tipiche di 20×20 cm con uno spessore dello strato di adsorbente maggiore di 0,25 mm (utilizzato nelle lastre analitiche). Si possono caricare quantità variabili di miscela a seconda dello spessore dello strato, del numero di componenti e dei rispettivi valori di R_f : tipicamente 15-25 mg di sostanza per strati da 0,5 mm, fino a 50 mg per strati da 1 mm, fino a 100 mg per strati da 2 mm. La deposizione della miscela va fatta non in un punto ma lungo una riga stretta avendo cura di non slargare la banda durante il caricamento. L'efficacia di una TLC preparativa dipende spesso da quanto sottile è la banda di caricamento, in quanto bande larghe di composti con R_f simili si sovrappongono maggiormente rispetto a bande strette, peggiorando la separazione.

La lastra viene quindi inserita nella camera di sviluppo precedentemente saturata con il solvente. I componenti della miscela sono infine recuperati segnando con una matita (mai una penna o pennarello!) il contorno della banda di interesse, grattando via lo strato di adsorbente all'interno di tale contorno con una spatola sottile, ponendo tale strato di adsorbente finemente suddiviso in una beuta contenente un solvente di sufficiente potere eluente, e filtrando dopo un tempo opportuno la miscela mediante un filtro in vetro a setto poroso. Per svaporazione del filtrato si ottiene infine il composto.

Cromatografia su colonna

Per tale cromatografia si utilizzano in genere colonne in vetro. Il rapporto ottimale altezza/diametro della colonna è di circa 8:1 e le dimensioni variano in funzione della quantità di sostanza da separare e quindi di fase stazionaria da utilizzare. Il rapporto miscela/adsorbente consigliabile è di 1/20-50 ma per miscele

Tabella 3.2.3 Dimensioni delle colonne per cromatografia di adsorbimento in funzione della quantità di adsorbente da utilizzare e del tipo di adsorbente.

Campione (g)	Adsorbente (g)	Dimensioni (diametro \times lunghezza, cm) per l'allumina	Dimensioni (d \times l, cm) per il gel di silice
0,1	5	0,8 \times 10	1,2 \times 15
0,5	25	1,3 \times 15	2,1 \times 25
1	50	2,1 \times 25	3,0 \times 38
5	250	3,5 \times 40	5 \times 60

di componenti di difficile separazione si possono usare rapporti fino a 1/100 o 1/200. In Tabella 3.2.3 sono riportate le dimensioni delle colonne in funzione della quantità di adsorbente da utilizzare e del tipo di adsorbente.

L'impaccamento, o riempimento della colonna con la fase stazionaria, è un'operazione molto delicata. Se non viene eseguita correttamente, si creano delle zone di disomogeneità nella fase stazionaria (es. crepe) che possono costituire vie preferenziali attraverso le quali la fase mobile si muove più rapidamente senza entrare in contatto con la fase stazionaria, diminuendo così l'efficienza della separazione.

I metodi di riempimento sono essenzialmente due:

- 1) si sospende la fase stazionaria nell'eluente e si versa il tutto nella colonna, vuota o precedentemente riempita di eluente, lasciando sedimentare lentamente e agevolando l'impaccamento battendo delicatamente la colonna con un oggetto di gomma (impaccamento a umido);
- 2) si introduce la fase stazionaria secca a piccole porzioni nella colonna vuota o contenente l'eluente; in entrambi i casi si cerca di ottenere un sedimento uniforme battendo la colonna ripetutamente (impaccamento a secco).

Il primo metodo è generalmente utilizzato per introdurre la silice, il secondo per l'allumina.

Completato l'impaccamento, si può coprire la superficie con uno strato di sabbia o di cotone o di carta da filtro per evitare lo svolazzamento del solido adsorbente.

Il caricamento della miscela sulla colonna viene eseguito facendo adsorbire sulla sommità della fase stazionaria il campione disciolto nella minima quantità di un opportuno solvente. La scelta del solvente per il caricamento dipende unicamente dalle caratteristiche di solubilità del campione. Generalmente è preferibile utilizzare lo stesso solvente usato come eluente. Tuttavia, per miscele di composti a polarità molto differente, è spesso necessario impiegare un solvente ad elevata polarità e quindi a potere eluente elevato. In questo caso la quantità di solvente da usare per solubilizzare il campione è **rigorosamente** la minima possibile per non influenzare negativamente la separazione cromatografica, in quanto il solvente polare altererebbe il potere eluente della fase mobile. Per evitare i problemi derivanti dal caricamento del campione in solventi polari si può seguire una procedura alternativa: si scioglie il campione in un pallone contenente un volume opportuno di un solvente volatile (etere etilico, acetato di etile, cloruro di metilene); si aggiunge una quantità di adsorbente pari a 4-5 volte il peso del campione; si svapora il solvente sotto vuoto (con cautela per evitare perdite di