

CROMATOGRAFIA



TECNICHE CROMATOGRAFICHE



In base alla forma del letto cromatografico

- Cromatografia su colonna
- Cromatografia planare

In base allo stato fisico della fase mobile

- Cromatografia liquida
- Gascromatografia
- Cromatografia fluida supercritica

In base al meccanismo di separazione

- Adsorbimento
- Ripartizione
- Scambio ionico
- Esclusione
- Affinità

MECCANISMI DELLA SEPARAZIONE



In base ai tipi di interazione molecolare fra l'analita e le due fasi (M ed S) possiamo suddividere i meccanismi di separazione impiegati in cromatografia in:

- **ADSORBIMENTO**
- **RIPARTIZIONE**
- **SCAMBIO IONICO**
- **ESCLUSIONE DI VOLUME**
- **AFFINITÀ**

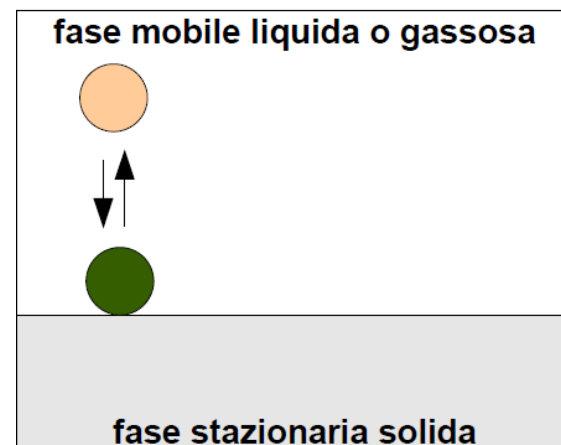
CROMATOGRAFIA DI ADSORBIMENTO

La fase stazionaria è un solido. Si basa sul fatto che alcuni materiali solidi hanno la capacità di trattenere le molecole alla loro superficie - sono coinvolte forze di interazione deboli, quali forze di Van der Waals e legami a idrogeno.

I diversi analiti si ripartiscono tra fase mobile e fase stazionaria (adsorbente) in modo diverso a seconda delle relative forze di interazione. Queste dipendono dalla natura chimica dell'adsorbente, della fase mobile e degli analiti.

La forza di legame di un analita dipende da specifici gruppi funzionali (-OH e aromatici aumentano le interazioni).

Un tipico adsorbente è la **silice**, che presenta gruppi silanolo (Si-OH). Altri adsorbenti comunemente usati sono **allumina** (ossido di alluminio) e **carbone**. La cromatografia di adsorbimento può essere condotta sia su strato sottile (TLC) che su colonna (HPLC). È il metodo più comunemente usato per la separazione di composti non ionici, insolubili in acqua, quali trigliceridi, vitamine, vari farmaci.



CROMATOGRAFIA DI RIPARTIZIONE

Tutti i metodi cromatografici si basano sulla ripartizione delle molecole che si vogliono separare tra due fasi, ma storicamente ci si riferisce alla cromatografia di ripartizione quando entrambe le fasi mobile e stazionaria sono liquide.

Confusione: si usano sostanze solide come la silice o la cellulosa. Queste fungono da supporto della reale fase stazionaria, costituita, per esempio, dall'acqua che si adsorbe alla matrice solida dopo essere stata mescolata con essa o perché è contenuta nella fase mobile in miscela con altri solventi. La cromatografia di ripartizione può essere eseguita in colonna o su strato sottile (Thin Layer Chromatography o TLC). La fase stazionaria e la fase mobile devono invece essere immiscibili. Durante l'eluizione le molecole si ripartiscono dinamicamente tra le due fasi secondo la diversa solubilità di ognuna.

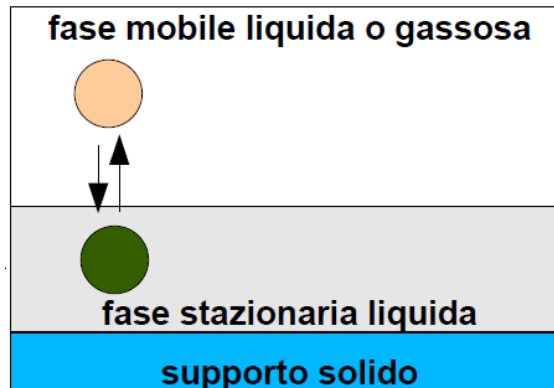
La cromatografia di ripartizione può essere **gas-liquido** o **liquido-liquido** a seconda della natura della fase mobile. **Gascromatografia e la cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC).**

Il fenomeno della ripartizione viene sfruttato per la separazione in colonna degli analiti, che a seconda delle caratteristiche chimico fisiche si legheranno più o meno stabilmente alla fase stazionaria e quindi avranno diverso tempo di ritenzione.

CROMATOGRAFIA DI RIPARTIZIONE

La cromatografia di ripartizione in fase normale: la fase stazionaria è più polare della fase mobile.

Fase inversa (Reverse Phase): la fase stazionaria è meno polare della fase mobile. Si tratta della tecnica più comunemente impiegata per la separazione di sostanze organiche.



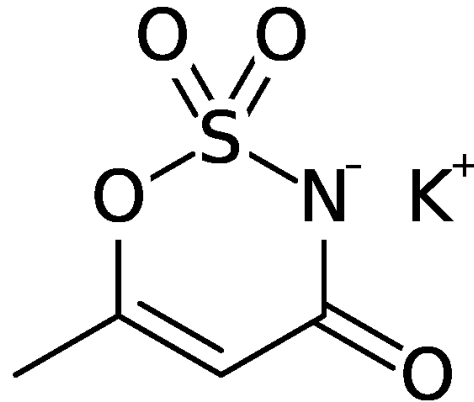
ESEMPIO DI ANALISI HPLC

How much pee is in our swimming pools? New urine test reveals the truth

Olympic swimmers admit to it and it seems many of the rest of us are peeing in the water too, with a new scientific test finding up to 75 litres of urine in public pools



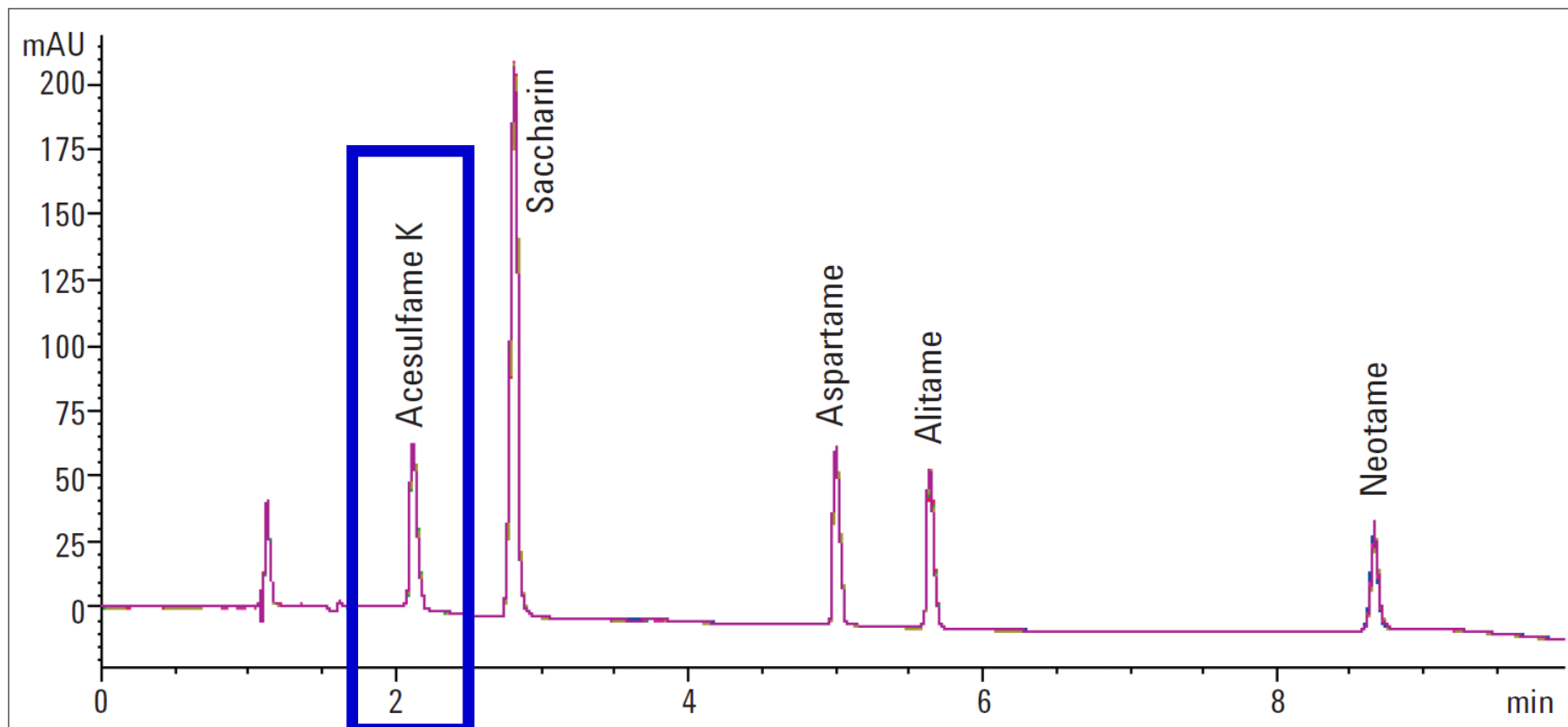
Il test funziona misurando la concentrazione di un dolcificante artificiale, l'acesulfame di potassio (ACE), che si trova comunemente negli alimenti confezionati e passa attraverso il corpo inalterato.



Dopo aver monitorato i livelli del dolcificante in due piscine pubbliche in Canada per un periodo di tre settimane, è stato calcolato che i nuotatori avevano rilasciato 75 litri di urina - sufficienti per riempire un bidone della spazzatura di medie dimensioni - in una grande piscina (circa 830.000 litri, un terzo delle dimensioni di una piscina olimpionica) e 30 litri in una seconda piscina, circa la metà delle dimensioni della prima.

La concentrazione di urina è stata rilevata più elevata nelle vasche idromassaggio

RP-HPLC-UV analysis



Column: Agilent ZORBAX SB-C18, 4.6 × 150 mm, 5 µm

Mobile phases:

A: Potassium phosphate dibasic (10 mM); pH 6.30

B: Acetonitrile

Flow rate: 1.2 mL/min

Column temperature: 30 °C

Detection: 210 nm

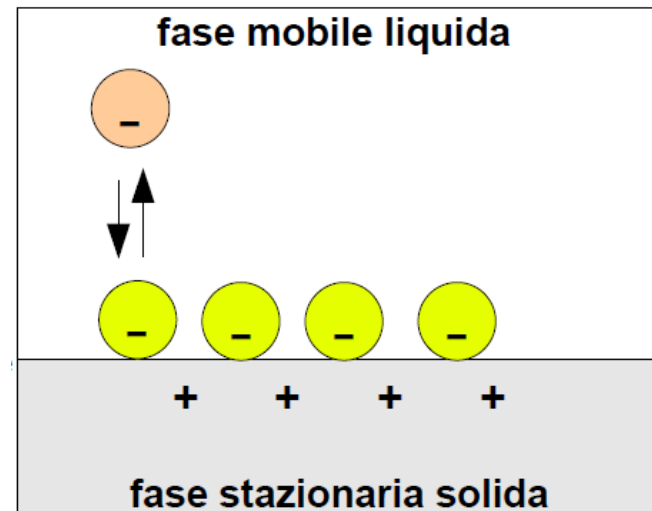
Gradient

Time (min)	% Acetonitrile
0.0	8
9.0	50
10.0	50
10.1	8
Stop time: 10 min	
Post time: 5 min	

CROMATOGRAFIA A SCAMBIO IONICO

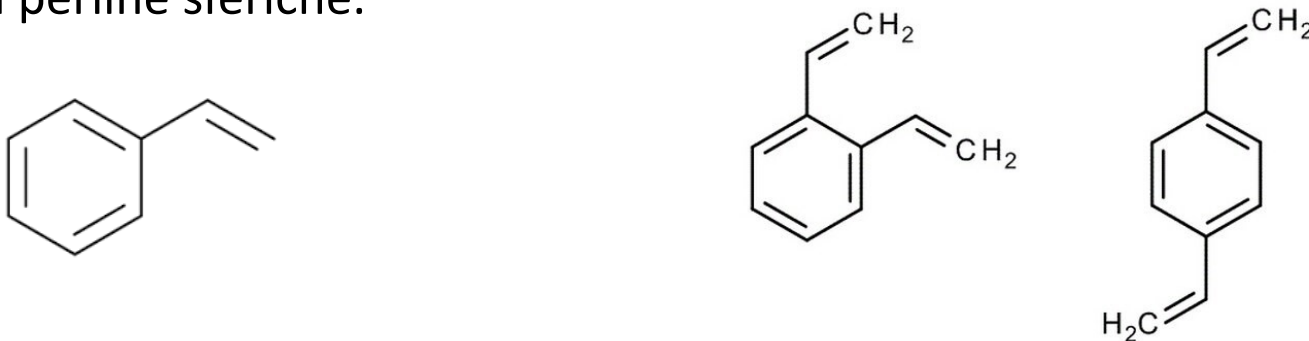
La fase stazionaria è costituita da una resina a scambio ionico (polimero inerte) contenente siti attivi ionizzati o ionizzabili, i cui contro-ioni possono essere scambiati con altri ioni aventi carica dello stesso segno. L'analita ha carica opposta alla fase stazionaria e dello stesso segno dei contro-ioni. Il meccanismo di separazione è basato sulla competizione per i siti di scambio tra gli ioni presenti nella fase mobile e quelli presenti nel campione. Quanto più è forte la carica del campione, tanto più verrà trattenuto all'interno della colonna. La fase mobile è una soluzione tampone acquosa in cui il pH e la concentrazione vengono regolati per controllare il tempo di eluizione degli analiti. Si parla di cromatografia di scambio ionico (IEC).

La cromatografia a scambio ionico è impiegata per la separazione di sostanze ioniche o ionizzabili.



CROMATOGRAFIA A SCAMBIO IONICO

La maggior parte delle resine a scambio ionico è basata sulla copolimerizzazione dello stirene e di un agente reticolante, divinilbenzene (DVB), per produrre una struttura reticolata in 3-D, per lo più fornita sotto forma di perline sferiche.



Il **grado di reticolazione** nelle resine a scambio ionico è variabile ed è scelto in funzione delle caratteristiche che deve presentare lo scambiatore.

Resine con alto grado di reticolazione: rigide e poco porose, lente nel raggiungere l'equilibrio, anche se la selettività e la capacità sono maggiori rispetto alle resine con basso grado di reticolazione

Resine a basso contenuto di legami crociati (dette anche macroporose): più permeabili, meno rigide più veloci ad equilibrarsi, ma si rigonfiano d'acqua.

CROMATOGRAFIA A SCAMBIO IONICO



Alternativa alle resine polistireniche

Derivati della cellulosa

- **Carbossimetil-cellulosa (CM-cellulosa)**
- **Di-etil-ammino-etil cellulosa (DEAE-cellulosa)**

Derivati del destrano (Sephadex) e dell'agarosio (Sepharose): sono correlati ai materiali usati nella cromatografia di esclusione. Uniscono il processo di scambio ionico a quello di filtrazione molecolare, migliorando la risoluzione complessiva

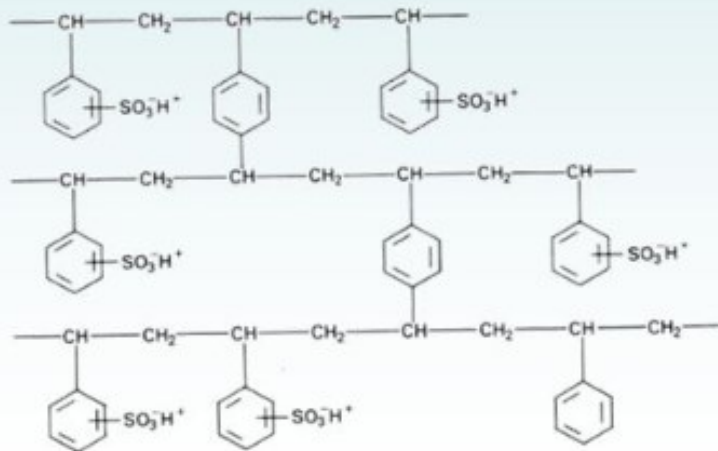
Tipi di Resine

La comune definizione delle resine ioniche è fatta sulla base della acidità del loro gruppo attivo

Ampio intervallo di pH di utilizzo

	Cationico	Anionico
Forte	$-\text{SO}_3^- \text{H}^+$	$-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3 \text{OH}^-$
Debole	$-\text{COO}^- \text{H}^+$	$-\text{N}^+\text{H}_3 \text{OH}^-$

Ridotto intervallo di pH di utilizzo



L'**affinità** maggiore per la fase resina è per ioni:

- a carica elevata,
- a piccolo raggio di idratazione,
- molto polarizzabili (polarizzabilità è capacità della nuvola elettronica di uno ione a venire deformata da cariche vicine e a formare un dipolo).



Resina a scambio ionico

ALTRI TIPI DI MATRICI

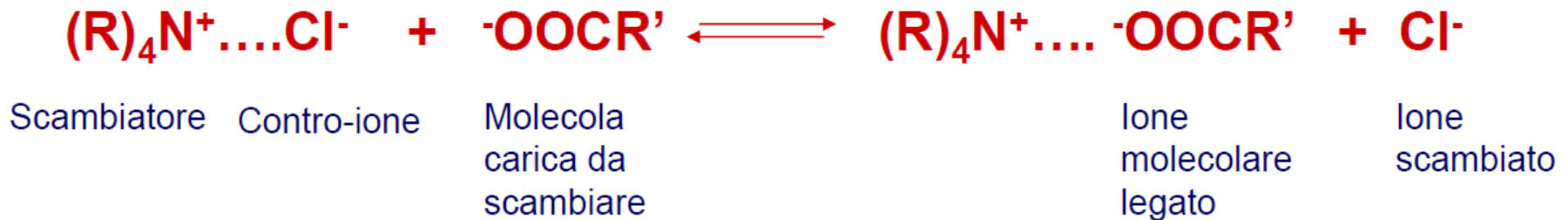
RESINA	SUPPORTO	GRUPPO FUNZIONALE	TIPO
DEAE Sepharose (Pharmacia) DEAE Bio-Gel A (Bio-Rad)	Agarosio	$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+\text{H}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$ dietilamminoetil (DEAE)	Scambio anionico (debole)
QAE Sephadex C50 (Pharmacia)	Destrano	Dietil-(2-idrossipropil) amminoetil (un ammina quaternaria)	Scambio anionico (forte)
CM Sepharose (Pharmacia)	Agarosio	$-\text{CH}_2\text{COO}^-$ Carbossimetil	Scambio cationico (debole)
SP Sephadex C50 (Pharmacia)	Agarosio	$-(\text{CH}_2)_3\text{SO}_3^-$ Sulfopropil	Scambio cationico (forte)

EQUILIBRI DI SCAMBIO IONICO

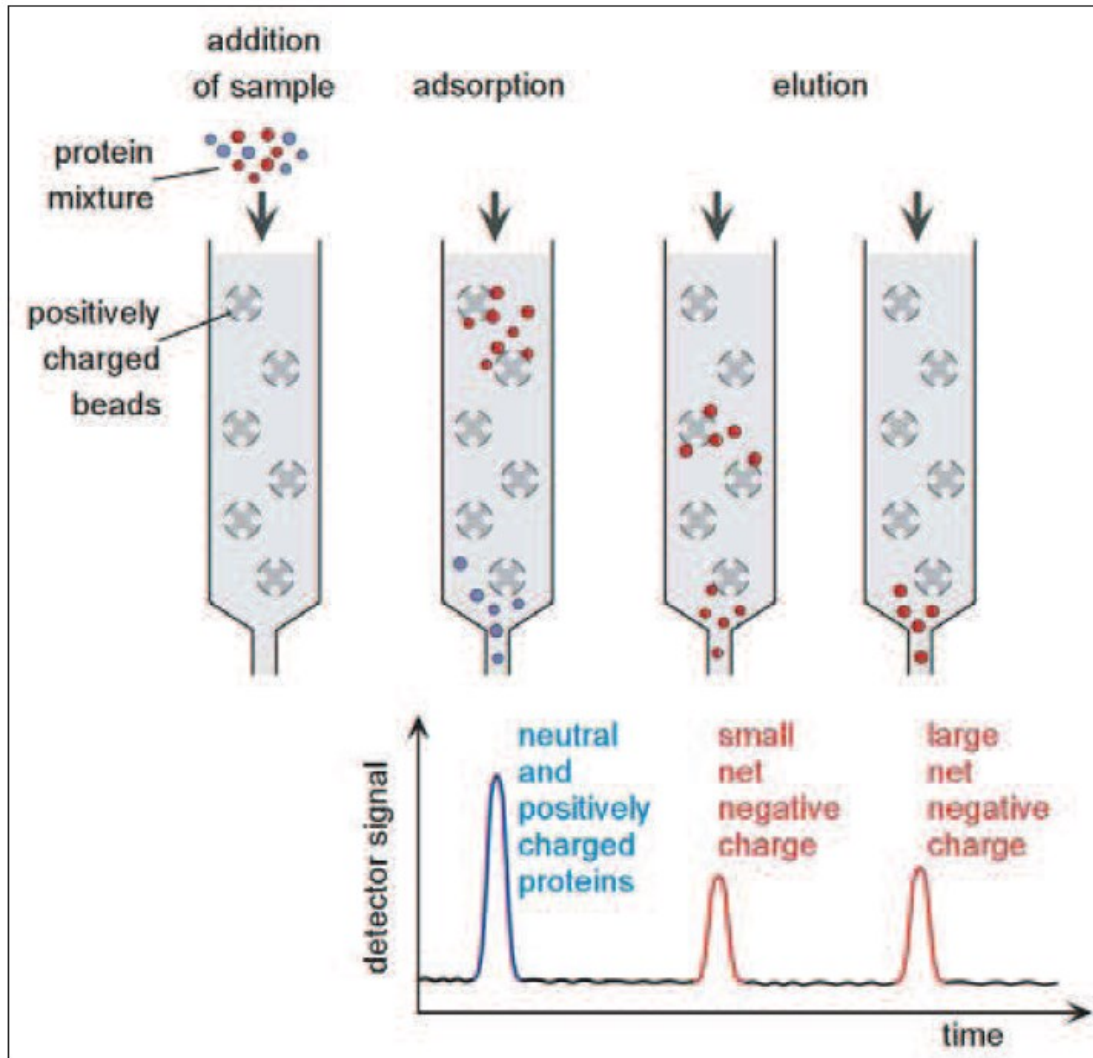
Scambiatore cationico



Scambiatore anionico

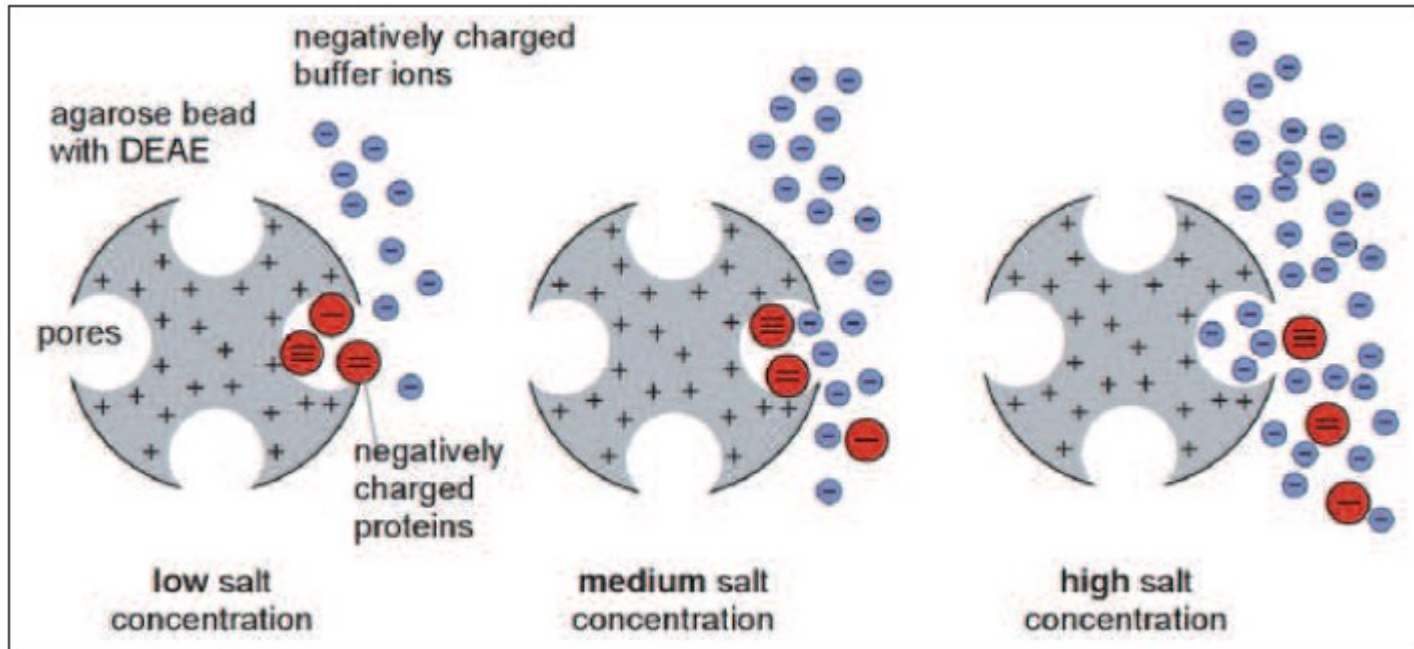


CROMATOGRAFIA A SCAMBIO IONICO



Principio della cromatografia a scambio ionico. I componenti del campione carichi negativamente sono adsorbiti sulla fase stazionaria e quindi separati sia da quelli carichi positivamente che non carichi. I componenti adsorbiti vengono quindi eluiti aumentando la forza ionica della fase mobile.

CROMATOGRAFIA A SCAMBIO IONICO



Il desorbimento degli analiti carichi negativamente da uno scambiatore di anioni avviene, per esempio, aumentando la concentrazione di sale. Gli analiti con una carica netta bassa vengono eluiti a concentrazione salina media, mentre gli analiti con una carica netta elevata richiedono una fase mobile con una elevata forza ionica prima di essere eluiti.

CROMATOGRAFIA A SCAMBIO IONICO



APPLICAZIONI

Separazione di amminoacidi

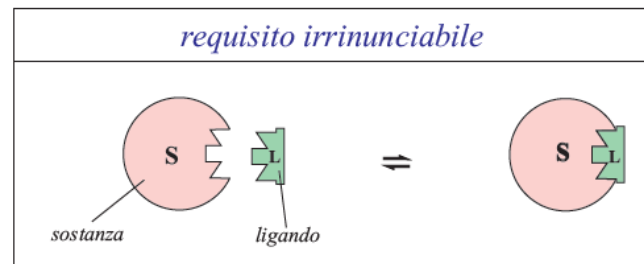
Separazione di proteine

Separazione di acidi nucleici

Separazione di saccaridi

CROMATOGRAFIA DI AFFINITÀ

A differenza degli altri tipi di cromatografia, dell'elettroforesi e della centrifugazione, non si basa sulle differenze nelle proprietà chimico-fisiche delle molecole da separare, ma **sfrutta le interazioni altamente specifiche che si possono instaurare tra molecole biologiche.**



In teoria si può raggiungere una purificazione completa in una singola tappa, anche partendo da miscele complesse.

Questa tecnica prevede che la molecola da purificare si leghi reversibilmente a un ligando specifico, immobilizzato su una matrice insolubile. L'introduzione in una colonna di affinità di una miscela, anche complessa, porterà al legame selettivo della molecola da purificare con la fase stazionaria, mentre gli altri componenti sono rimossi con un lavaggio. La molecola di interesse viene recuperata eluendo la colonna con un tampone opportuno.

CROMATOGRAFIA DI AFFINITÀ



Requisito: conoscere la struttura e le proprietà di legame della molecola che si vuole isolare, per utilizzare il giusto **ligando** e scegliere (o sintetizzare) una buona resina d'affinità. Sono disponibili in commercio numerose resine per cromatografia di affinità, ma si può preparare in laboratorio la propria resina, immobilizzando su una matrice il ligando che abbiamo scelto per la purificazione della molecola di nostro interesse.

Il ligando utilizzato, che di solito è legato a un braccio spaziatore per renderlo più accessibile alla molecola di interesse, deve avere le seguenti caratteristiche:

1. il gruppo chimico da legare alla matrice o al braccio spaziatore non deve essere coinvolto nel legame con la molecola da purificare. Questi gruppi sono generalmente gruppi amminici, carbossilici, tiolici, alcolici o fenolici;
2. deve essere attaccato alla matrice in modo da non interferire con la capacità di legare la molecola di interesse;
3. deve consentire una velocità di flusso adeguata;
4. il braccio spaziatore tra ligando e matrice deve avere una lunghezza di 6-10 atomi di carbonio

CROMATOGRAFIA DI AFFINITÀ



La matrice ideale da utilizzare nella cromatografia di affinità deve possedere le seguenti caratteristiche:

1. deve contenere gruppi reattivi numerosi e adatti a legare covalentemente il ligando e deve risultare stabile nelle condizioni in cui avviene tale attacco;
2. deve essere stabile nelle condizioni d'interazione della macromolecola e nella successiva eluizione;
3. non deve interagire, se non debolmente, con altre macromolecole, per evitare un adsorbimento aspecifico;
4. deve possedere buone capacità di flusso.

Si usano le stesse matrici utilizzate nella gel-filtrazione e nello scambio ionico, che hanno caratteristiche ottimali di stabilità e capacità di flusso: derivati del destrano e poliacrilammide (Sephacryl S), dell'agarosio (Sephacrose 4B e 6B, Bio-Gel A), da poliacrilammide (Bio-Gel P) e cellulosa. Vengono attivate con l'introduzione di gruppi reattivi che serviranno per immobilizzare il ligando.

CROMATOGRAFIA DI AFFINITÀ



Altri esempi di resine per cromatografia di affinità disponibili commercialmente sono quelle che si usano per la **purificazione delle proteine ricombinanti che presentano dei tag (etichetta)**.

Es: Resine in cui il ligando è un anticorpo diretto contro il tag stesso (soprattutto nel caso di tag peptidici)

Il legame tra matrice e ligando, o tra braccio spaziatore e ligando, deve essere un legame stabile, in modo da permettere il riutilizzo della resina.

Il legame tra ligando e molecola di interesse da separare deve essere reversibile.

CROMATOGRAFIA DI AFFINITÀ



È possibile scegliere un ligando che abbia:

- una **specificità assoluta di legame** per una singola proteina: un anticorpo, un inibitore di un enzima, un ligando di un recettore
- una **selettività per un determinato gruppo chimico**.

CROMATOGRAFIA DI AFFINITÀ

Ligandi gruppo-specifici:

- nucleotidi: specifici per le proteine che legano i nucleotidi
- avidina: specifica per la biotina
- Eparina: specifica per i fattori della coagulazione e per le proteine che legano il DNA
- proteine A e G: specifiche per la porzione costante Fc delle immunoglobuline IgG
- concanavalina A (lectina): specifica per il mannosio presente nelle glicoproteine)
- frammenti poli-T (specifici per gli mRNA eucariotici che contengono la coda di poli-A)
- Cibacron Blue F3G-A: specifico per l'albumina e per le proteine che legano i nucleotidi.

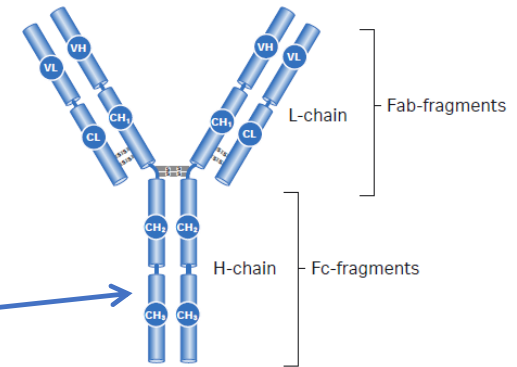
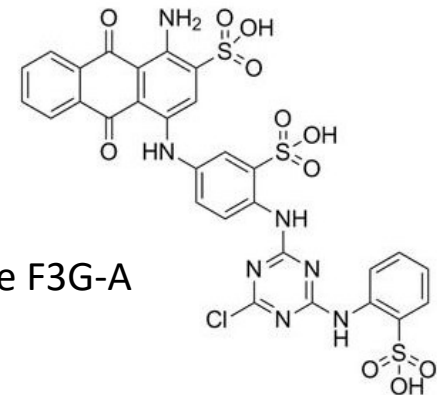


Fig 1.1. Basic H2L2 structure of a typical immunoglobulin.



Cibacron Blue F3G-A

CROMATOGRAFIA DI AFFINITÀ



Procedura per la cromatografia di affinità

Simile a quella usata nelle altre cromatografie liquide.

Il tampone di equilibratura deve favorire il massimo di interazione con la molecola da purificare; in genere si usano tamponi contenenti sali (NaCl 0,25-0,5 M) per minimizzare le interazioni non specifiche tra le molecole e la matrice.

Una volta applicato il campione, la colonna viene lavata con lo stesso tampone, per allontanare i composti che non interessano

Eluizione: aspecifica o per competizione.

Eluizione aspecifica:

- variazione di pH o forza ionica, che provoca una diminuzione della forza del legame tra molecola e ligando. Solitamente si usano a questo scopo concentrazioni di NaCl fino a 1 M, oppure agenti caotropici (=classe eterogenea di composti organici che possiedono la capacità di rompere i legami idrofobici e i legami idrogeno con conseguente denaturazione), quali cloruro di guanidinio e urea, che però rischiano di provocare la denaturazione della proteina.
- modificazione della temperatura

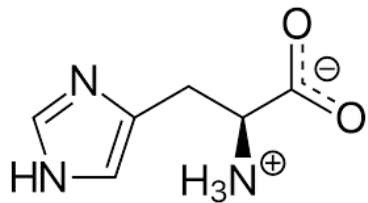
CROMATOGRAFIA DI AFFINITÀ

Eluizione per competizione:

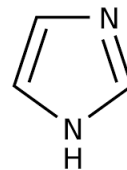
aggiunta di un eccesso di ligando libero nel tampone di eluizione. Tuttavia, il ligando potrebbe essere molto costoso e se il legame è piuttosto forte possono essere necessarie elevate concentrazioni di ligando libero.

Il materiale così eluito contiene anche gli agenti impiegati per l'eluizione, che dovranno essere successivamente rimossi.

Un esempio di eluizione per competizione è quello che si ottiene con l'imidazolo nella cromatografia su metalli immobilizzati per purificare le proteine ricombinanti che hanno l'His-tag. In questo caso, data l'economicità dell'imidazolo, i costi sono molto contenuti e questa cromatografia è ampiamente utilizzata



istidina



imidazolo

CROMATOGRAFIA DI AFFINITÀ

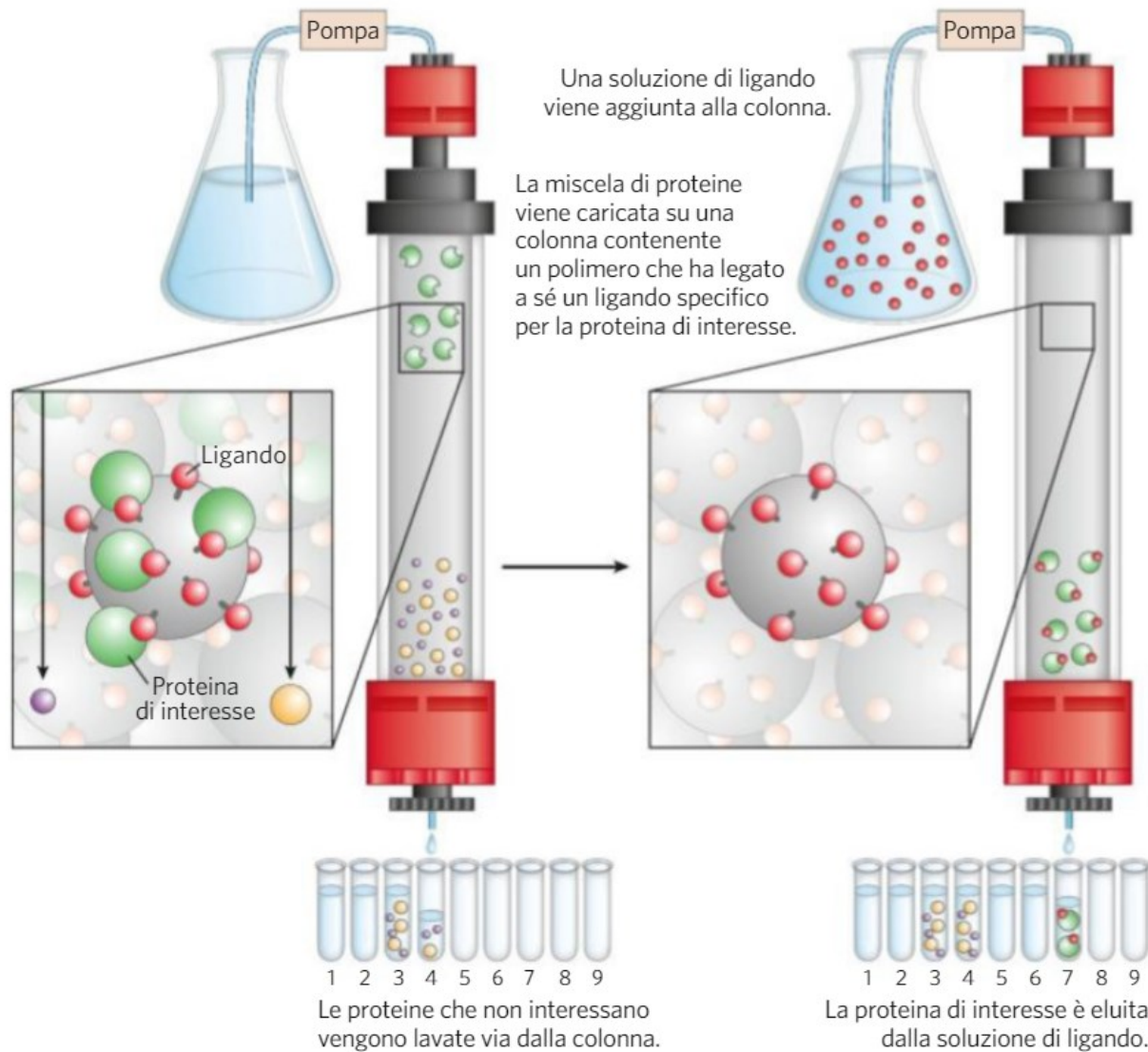


Table 4: Features of some commercially available affinity tags

	Amino acid sequence	DNA Sequence	Size	Specificity of interaction (KD)	Protein Yield per ml resin	Elution conditions
Poly His-tag	6-14 Histidine residues	CAT CAC CAT CAC CAT CAC	840.8-1,937.9 Dalton	10 µM	up to 80 mg/ml (1)	Imidazole or histidine, or at low pH
GST tag	GST tag protein (whole protein)	CLICK HERE	26 kDa protein	1 µM	10-12 mg/ml	Reduced glutathione
Strep® tag	WSHPQFEK	TGG TCG CAT CCG CAG TTC GAG AAG	1,058.1 Dalton	300 nM	up to 9 mg/ml	Desthiobiotin or biotin
Rho1D4 / 1D4 tag	TETSQVAPA	ACC GAG ACT TCC CAG GTG GCG CCA GCT	902.9 Dalton	20 nM (4)	3-4 mg/ml	Rho1D4 peptide , low pH, or protease digest
FLAG® tag	DYKDDDDK	GAC TAC AAA GAC GAT GAC GAC AAG	1,012.9 Dalton	100 nM	0.6-1 mg/ml	DYKDDDDK peptide

K_d = costante di dissociazione. Usata per descrivere l'affinità tra un ligando (**L**) e una proteina (**P**), cioè per descrivere quanto è forte il legame tra un ligando e una particolare proteina. La formazione di un complesso ligando-proteina (**C**) può essere descritta dal seguente equilibrio:



nel quale la corrispondente costante di dissociazione è definita come : $K_d = \frac{[P][L]}{[C]}$

CROMATOGRAFIA DI AFFINITÀ



I problemi più rilevanti della cromatografia di affinità:

- la bassa capacità della fase stazionaria
- la scelta del gruppo chimico da legare (tra un ligando di maggiori dimensioni e uno di minori dimensioni è più opportuno scegliere quello di maggiori dimensioni)
- la stabilità del legame ligando-matrice o ligando-braccio spaziatore, che può determinare una progressiva perdita di ligando.

A causa della complessità della preparazione delle resine di affinità (che spesso vengono progettate e costruite su misura dal ricercatore) e del suo elevato costo, il metodo è consigliato per purificare proteine che rappresentano una piccola percentuale delle proteine totali presenti in una miscela. Anche in questo tipo di cromatografia, le resine possono essere utilizzate più volte, dopo un trattamento di rigenerazione che è specifico per ogni tipo di fase stazionaria.

CROMATOGRAFIA DI AFFINITÀ



SEPARAZIONE DI PROTEINE CONTRASSEGNALE DA UN TAG

La purificazione delle proteine mediante cromatografia di affinità è una tecnica potente per separare le proteine di interesse da una miscela.

Le proteine sono contrassegnate da "tag" che conferiscono loro proprietà di legame specifiche.

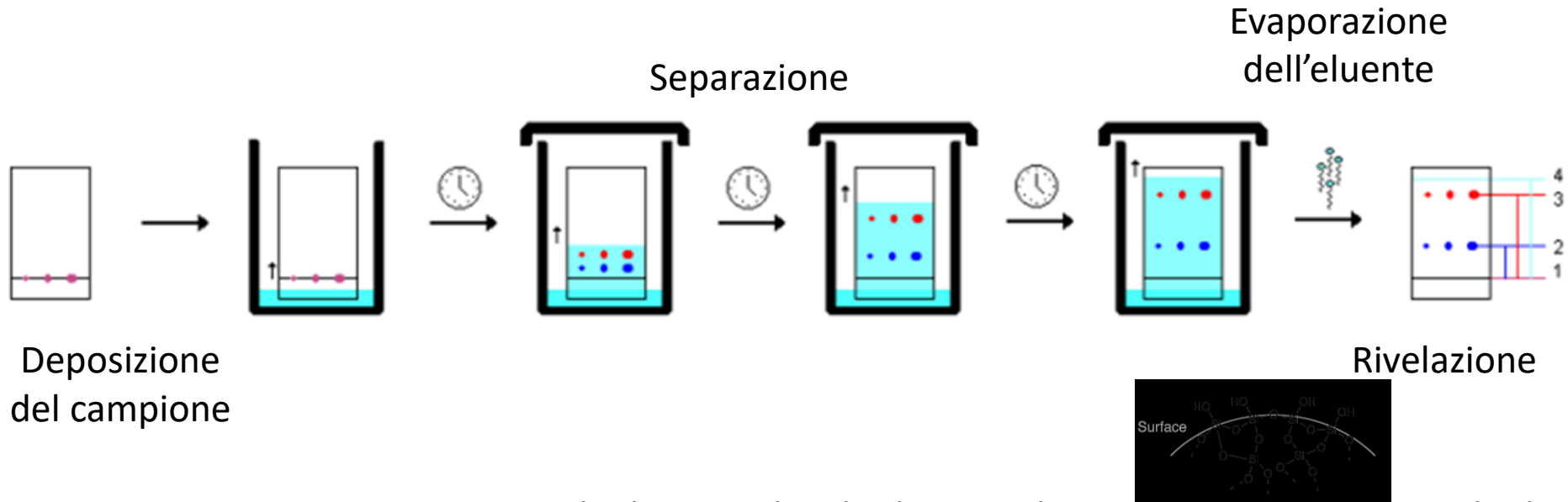
Un opportuno ligando immobilizzato alla resina si lega alla proteina marcata. Quindi la proteina di interesse è separata dal resto del campione.

ESERCITAZIONE!!!!

VIDEO ON PROTEIN SEPARATION TECHNIQUES

<https://www.youtube.com/watch?v=MvcJuEaPiNQ>

Cromatografia planare su strato sottile (TLC)



- Fase stazionaria: uno strato sottile di materiale adsorbente, solitamente gel di silice o ossido di alluminio (allumina), depositato sulla superficie di una lastra di materiale inerte, generalmente vetro, plastica o alluminio.
- Si semina una goccia del campione su un'estremità della lastra da TLC che viene poi posizionata verticalmente in una camera chiusa contenente un solvente organico (fase mobile) sul fondo.
- La fase mobile risale lungo la superficie della lastra per capillarità; i componenti del campione migrano a distanze variabili, in base alle rispettive affinità differenziali per la fase stazionaria e quella mobile. Quando il solvente raggiunge l'estremità superiore della lastra, questa viene rimossa dalla camera di sviluppo e lasciata asciugare.
- I componenti separati vengono visualizzati sulla lastra sotto forma di macchie e per ciascuno si valuta il fattore di ritenzione (R_f).

Cromatografia planare su strato sottile (TLC)

La TLC si può considerare una moderna evoluzione della cromatografia su carta (PC). I meccanismi di separazione dei componenti delle miscele, si basano sui fenomeni di:

- **adsorbimento:** se la fase stazionaria è costituita da un solido granulare attivo (dotato della capacità di formare sulla superficie dei granuli legami chimici con le molecole dei componenti le miscele)
- **ripartizione:** se la fase stazionaria è un liquido fissato su un supporto solido granulare, possibilmente del tutto inerte
- **scambio ionico:** se la fase stazionaria ha la capacità di scambiare ioni (per es. cellulose modificate come quelle fosforilate, carbossimetil cellulose ecc.)
- **esclusione:** se la fase stazionaria è un gel del tipo setaccio molecolare

Cromatografia planare su strato sottile (TLC)

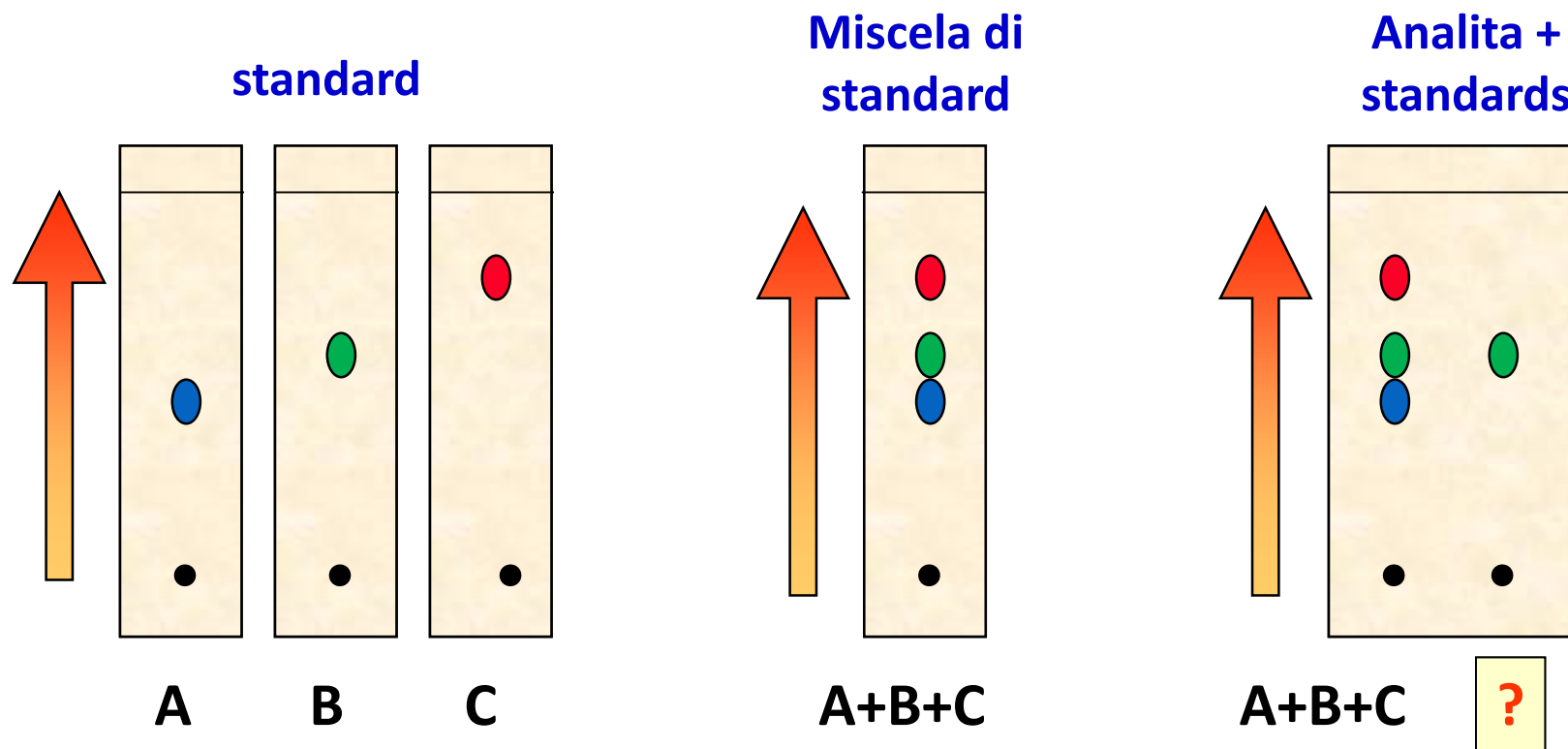
Per quanto riguarda le **applicazioni** di questa tecnica è opportuno precisare che:

- riveste un ruolo di primo piano nel campo dell'analisi qualitativa organica per l'identificazione dei composti
- è una tecnica utilissima nel campo della ricerca, nella separazione di isomeri difficilmente separabili
- può essere usata a scopo preparativo (Prep TLC) impiegando lastre con strati di fase stazionaria a maggiore spessore, per separare componenti difficilmente separabili, accumulandone quantità piccole ma sufficienti per altre indagini strumentali (analisi spettrofotometriche, MS, NMR)
- è meno impiegata per le determinazioni quantitative dei componenti separati
- non riveste un ruolo importante nel campo dell'analisi ambientale.

Vantaggi:

- Basso costo
- Velocità (seguire l'andamento di una reazione chimica di sintesi)
- separazione di isomeri difficilmente separabili in altri modi

Cromatografia planare su strato sottile (TLC)



La TLC permette di analizzare potenzialmente qualsiasi classe di sostanze, inclusi pesticidi, steroidi, alcaloidi, lipidi, nucleotidi, glicosidi, carboidrati e acidi grassi.

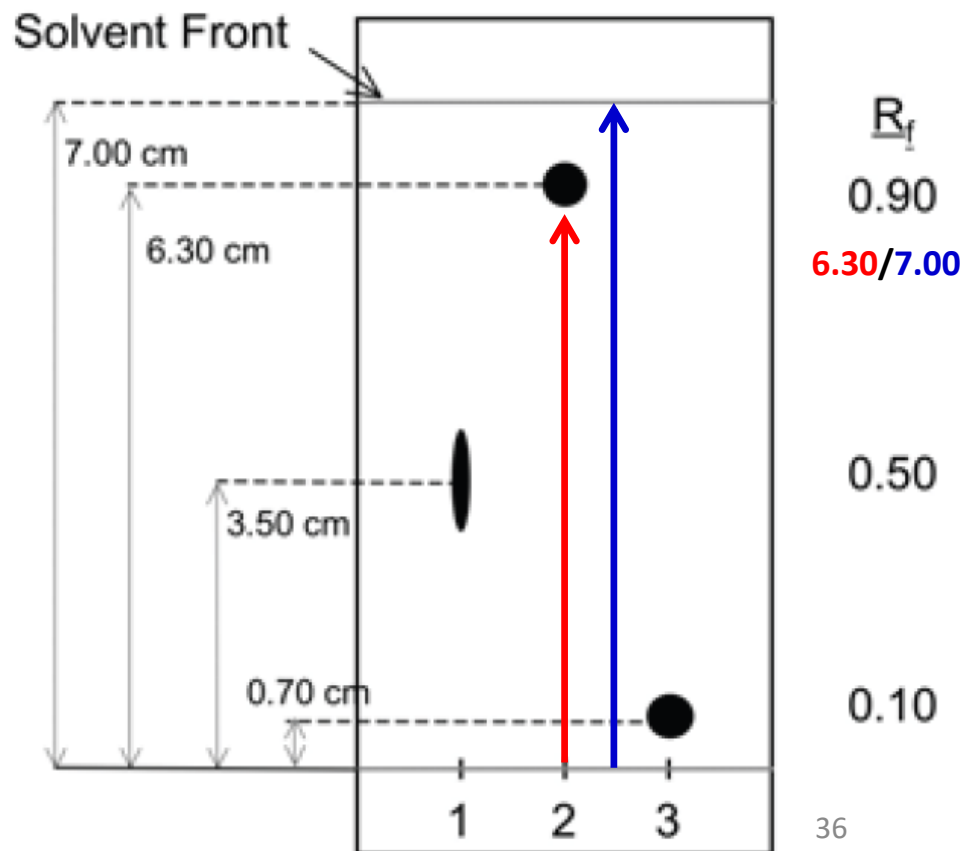
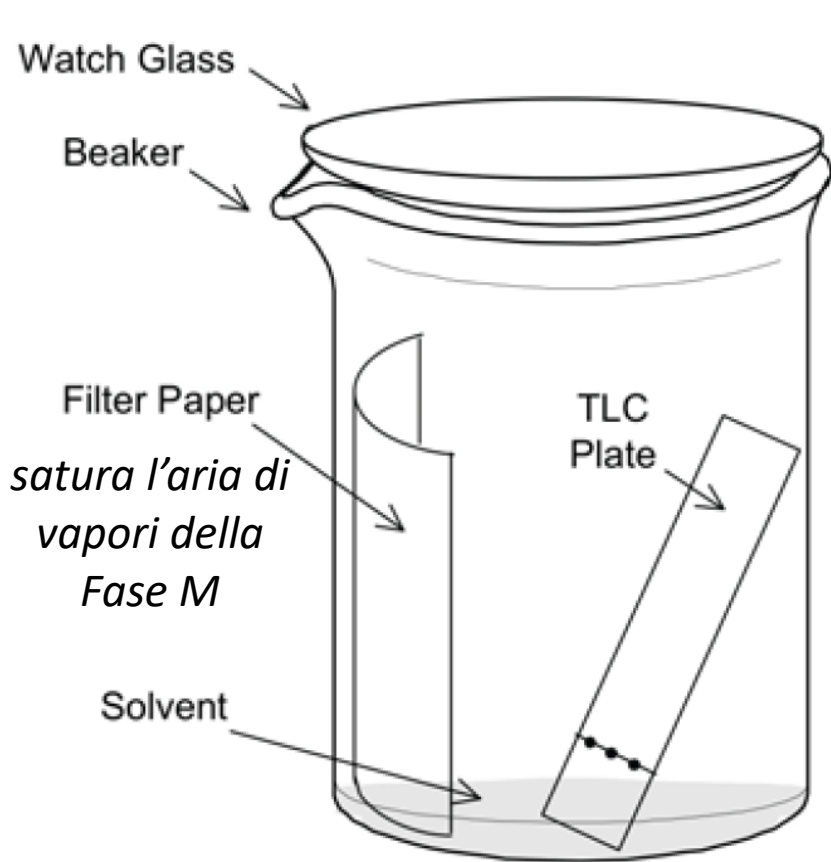
Cromatografia su strato sottile (TLC)

Scelta della Fase M: accoppiare la polarità del solvente a quella dell'analita da separare.

Analiti idrosolubili: strati di cellulosa o di gel di silice ed un solvente relativamente polare

Analiti meno polari: strati di gel di silice attivato o di allumina e un solvente non acquoso, relativamente apolare.

La risoluzione è misurata da R_f . L'eluizione dipende dalla struttura della molecola



Fase mobile

in genere **solventi organici** a diversa polarità: n-esano, eptano, cicloesano, CCl_4 , benzene, CHCl_3 , etere dietilico, acetato di etile, piridina, acetone, metanolo, acqua.

Tali solventi possono essere usati **puri o in miscela** tra loro, in diverse proporzioni



polarità

serie eluotropa su *gel di silice*.

Miscela o solventi puri	composizione
Benzene	
Benzene/cloroformio	1+1
Cloroformio	
Cicloesano/acetato d'etile	8+2
Cloroformio/acetone	95+5
Benzene/acetone	9+1
Benzene/acetato d'etile	8+2
Cloroformio/dietiletere	9+1
Benzene/metanolo	95+5
Benzene/dietiletere	6+4
Cicloesano/acetato di etile	1+1
Cloroformio/dietiletere	8+2
Benzene/acetone	8+2
Cloroformio/metanolo	99+1
Benzene/metanolo	9+1
Cloroformio/acetone	85+15
Benzene/dietiletere	4+6
Benzene/acetato di etile	1+1
Cloroformio/dietiletere	6+4
Cicloesano/acetato d'etile	2+8
Acetato di butile	
Cloroformio/metanolo	95+5
Cloroformio/acetone	7+3
Benzene/acetato di etile	3+7
Acetato di butile/metanolo	99+1

Rivelazione mediante radiazione UV

Metodo di visualizzazione non distruttivo più comune. Può essere utilizzata una lampada UV a onde corte (254 nm) o lunghe (365 nm). La maggior parte delle lastre per TLC acquistate in commercio contiene un materiale fluorescente (ad esempio solfuro di zinco) nella silice o nell'allumina, quindi lo sfondo della lastra apparirà verde durante la visualizzazione con luce UV a onde corte. Se un composto assorbe la luce UV 254 nm, apparirà scuro poiché il composto impedisce al materiale fluorescente di ricevere la luce UV.

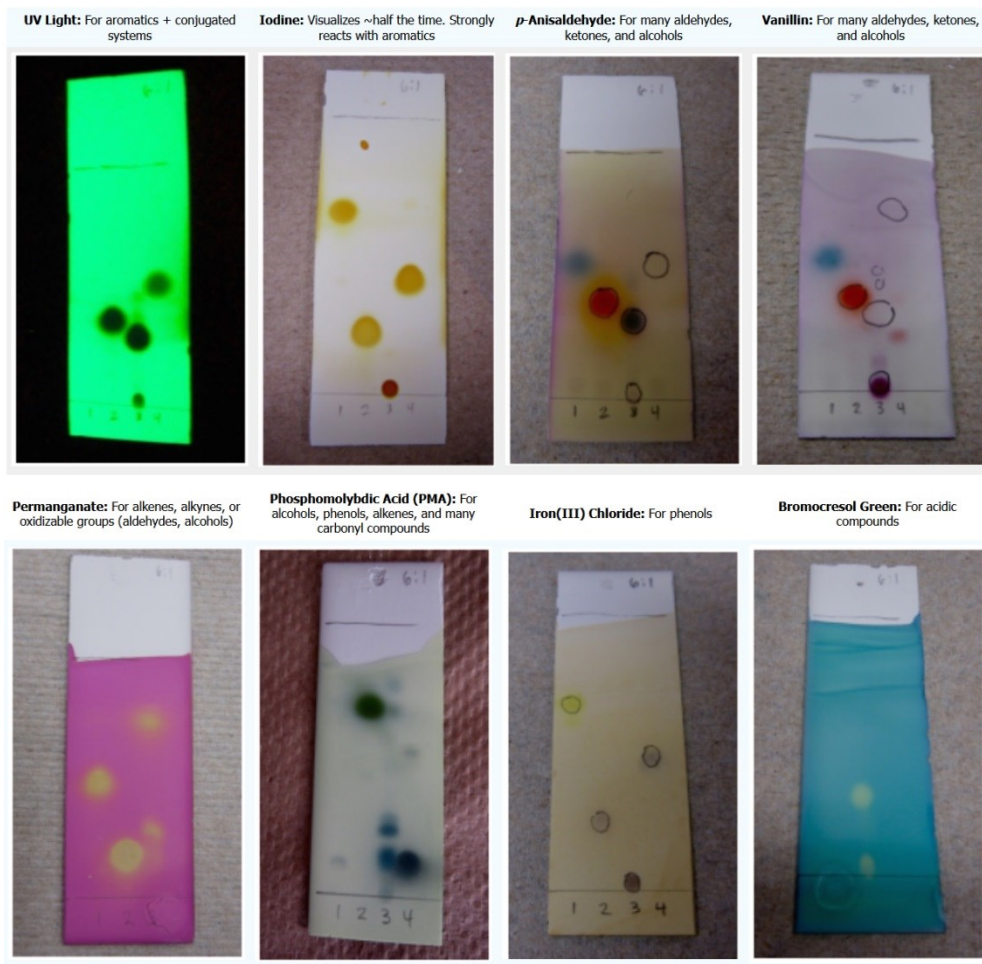
Metodo facile e veloce. Utile per visualizzare composti aromatici e sistemi altamente coniugati, poiché questi assorbono fortemente i raggi UV. La maggior parte degli altri gruppi funzionali non assorbe la luce UV alle lunghezze d'onda utilizzate e non apparirà scura sotto la lampada UV anche se presenti. Poiché i composti rimangono invariati dopo la visualizzazione con luce UV, un'ulteriore tecnica di visualizzazione può essere utilizzata successivamente sulla stessa lastra.



Figure 2.31: a) Tilting a UV lamp to visualize a TLC plate, b) Box to protect eyes from UV damage, c) Appearance under UV.

Rivelazione chimica

In altri casi si applicano composti che (di solito dopo riscaldamento ad alta temperatura) rivelano le macchie. La reazione può essere universale o specifica



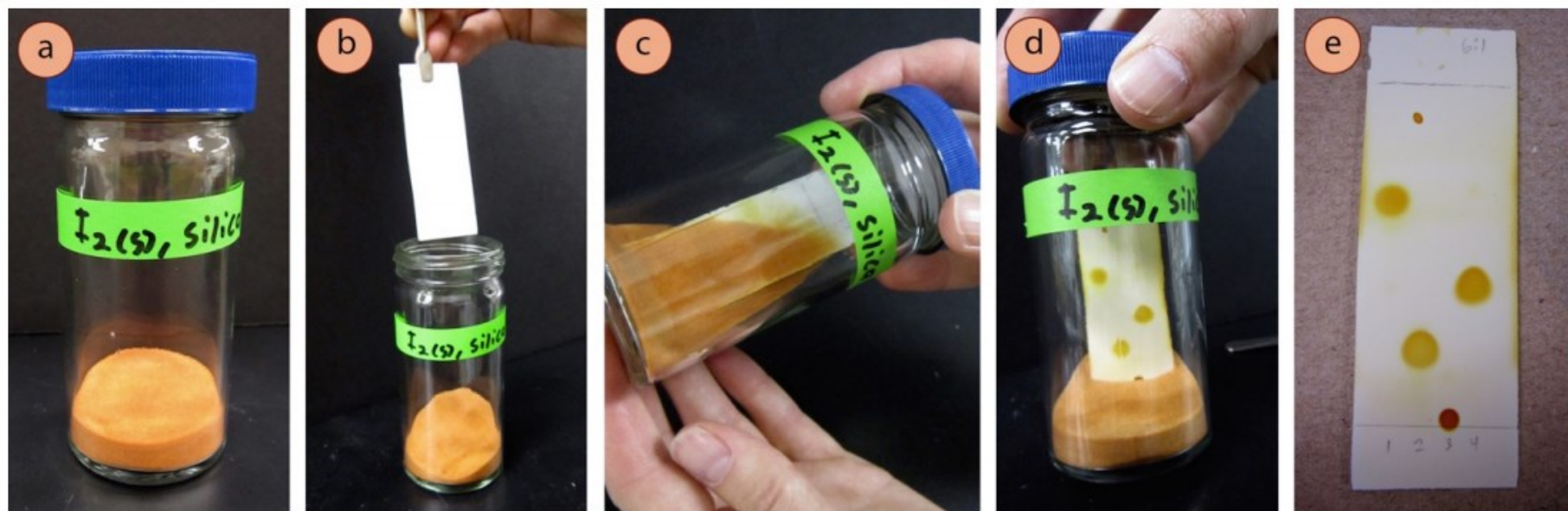


Figure 2.33: a) An iodine chamber using silica gel, b-d) Inserting a plate into the chamber and jostling, e) Developed TLC plate with iodine.

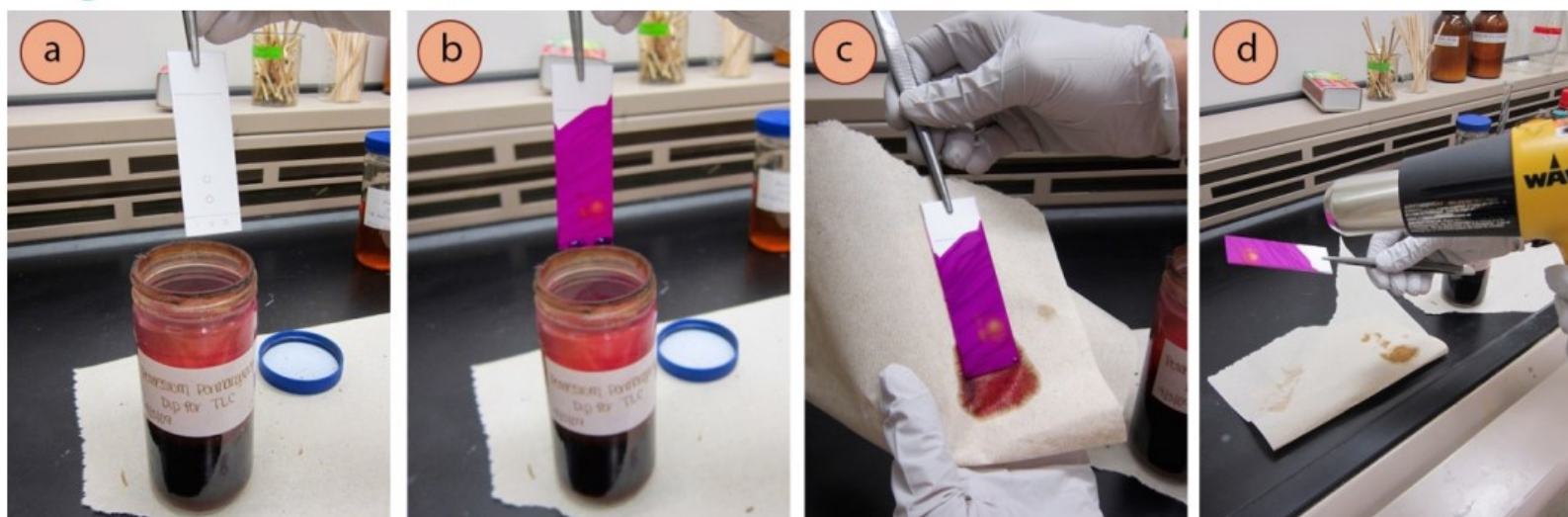


Figure 2.34: Staining sequence using permanganate stain: a) Inserting plate into the dip, b) Letting it drip, c) Wiping the back, d) Heating the plate with a heat gun.

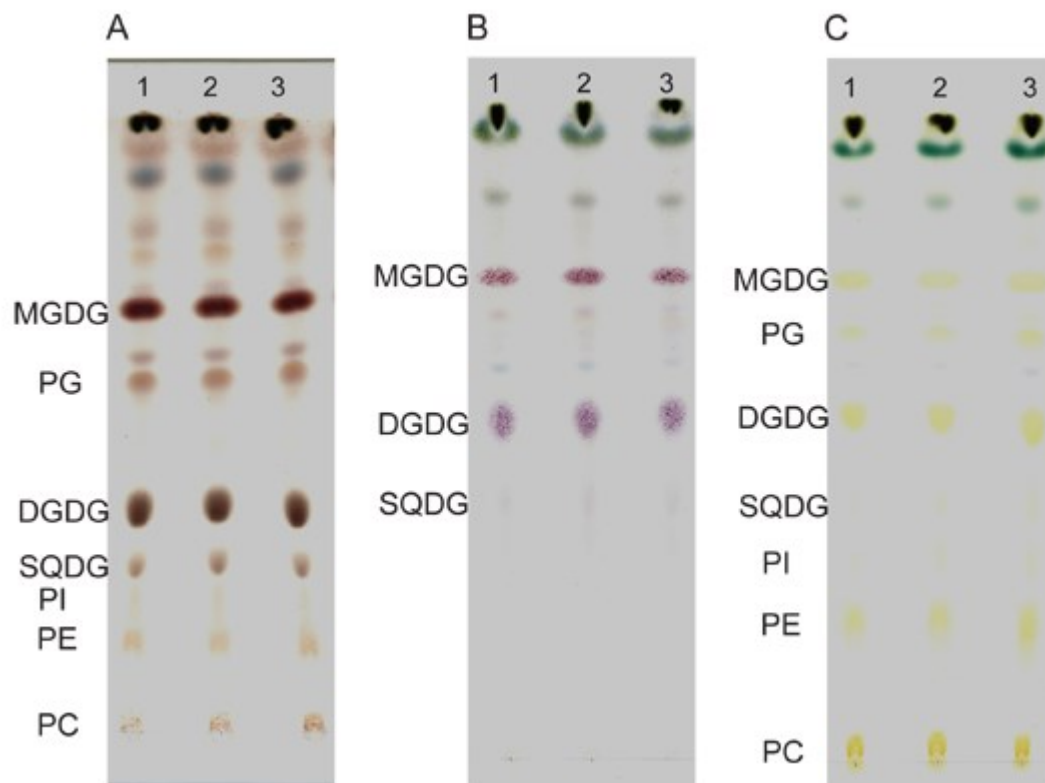


Figure 2. Separation of lipids on TLC plates. Lipid extracts of 35 mg (fresh weight) wild type seedlings are separated by TLC and stained by sulfuric acid (A), α -naphthol (B) or iodine vapor (C). Three repeats are shown in each staining method. DGDG, digalactosyldiacylglycerol; MGDG, monogalactosyldiacylglycerol; PC, phosphatidylcholine; PE, phosphatidylethanolamine; PG, phosphatidylglycerol; PI, phosphatidylinositol; SQDG, sulfoquinovosyldiacylglycerol.

Applicazioni

- ✓ Per determinare il numero di componenti una miscela;
- ✓ Per determinare l'identità di sostanze;
- ✓ Per la messa appunto delle condizioni più adatte allo svolgimento di una cromatografia su colonna;
- ✓ Per controllare il progresso di una reazione chimica;
- ✓ Per determinare l'efficacia di una purificazione;
- ✓ Per monitorare l'andamento di una cromatografia su colonna;
- ✓ Per svolgere analisi microanalitiche.

Vantaggi

- ✓ Semplicità di esecuzione
- ✓ Rapidità d'esecuzione
- ✓ Tecnica molto economica
- ✓ Richiede minime quantità di sostanza
- ✓ Tecnica sensibile
- ✓ Le lastrine possono essere trattate con una varietà di sostanze chimiche che impartiscono alla fase stazionaria un'ampia gamma di proprietà

Svantaggi

Numero di piatti teorici limitato

La TLC è ampiamente utilizzata in numerosi settori industriali e della ricerca, come l'ambito farmaceutico, le analisi cliniche, la tossicologia ambientale, le analisi di alimenti, acque e pesticidi, la cosmetica.

Cromatografia planare su strato sottile (TLC)

I principali parametri con cui si valutano le prestazioni di una TLC sono:

- **selettività**

si valuta misurando i rispettivi fattori di ritenzione (R_f) dei componenti; più sono diversi tra loro maggiore è la selettività

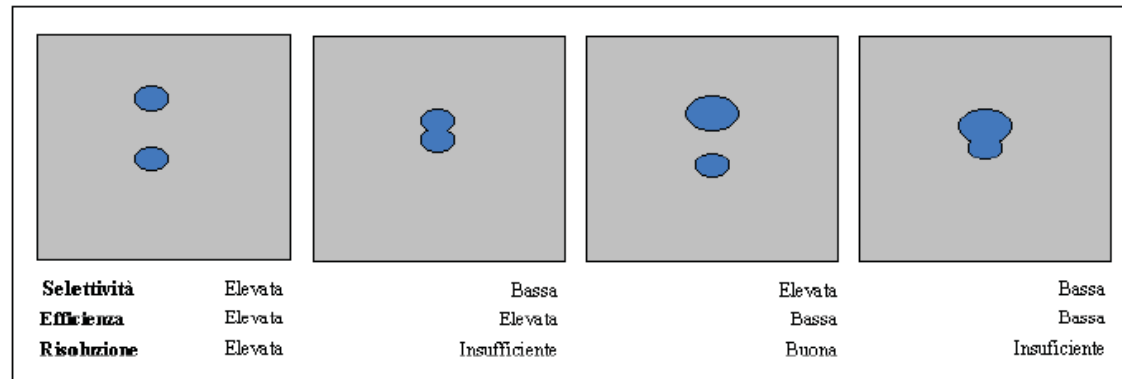
- **efficienza**

capacità delle macchie dei singoli componenti, di migrare compatte.
fattori che influenzano l'efficienza:

- diametro medio dei granuli
- omogeneità dei diametri dei granuli
- omogeneità nell' impaccamento dello strato

- **risoluzione**

attitudine del sistema a dare alla fine della corsa macchie ben distinte



TLC e HPTLC

TLC e HPTLC sono due tecniche chimiche utilizzate per separare i componenti non volatili in una miscela.

HPTLC = High Performance TLC. È una tecnica avanzata rispetto al metodo TLC.

La risoluzione e la precisione di HPTLC sono molto elevate. La maggior parte dei passaggi di questa tecnica può essere automatizzata.

Le piastre utilizzate in HPTLC contengono particelle di gel di silice di dimensioni molto ridotte e la densità di impaccamento del gel sulla piastra è elevata. La superficie della piastra è liscia e consente una separazione efficiente. L'analisi è più veloce della tecnica TLC. Anche la sensibilità di questo metodo è elevata.

DIFFERENCES BETWEEN CLASSICAL TLC, HPTLC, AND PTLC

Properties	Classical TLC	HPTLC	Preparative (PLC)
Applications	Quick, inexpensive, flexible and classical separations	Highly sophisticated separations, complex samples	Purification on a TLC plate
Analysis	Qualitative	Qualitative & Quantitative	Quantitative
Detection	UV - Stains	Instrumented analysis (<i>use of scanners for detection</i>)	UV
Distribution [Mean Particle Size]	5 - 20 μm [10 - 14 μm]	4 - 8 μm [5 - 6 μm]	5 - 40 μm [22 - 25 μm]
Layer Thickness	200 - 250 μm	150 - 200 μm	500 - 2,000 μm
Typical Sample Volume	1 - 5 μL	0.1 - 0.5 μL	5 - 20 μL