
Metodologie sintetiche ed analitiche
in chimica farmaceutica

Tecniche di lavorazione/separazione
in laboratorio chimico

CROMATOGRAFIA SU COLONNA

CROMATOGRAFIA SU COLONNA

La cromatografia su colonna è una tecnica preparativa di purificazione applicabile sia per composti solidi che per liquidi.

Tale tecnica consente di separare i componenti di una miscela in base alla loro capacità di ripartirsi tra due fasi:

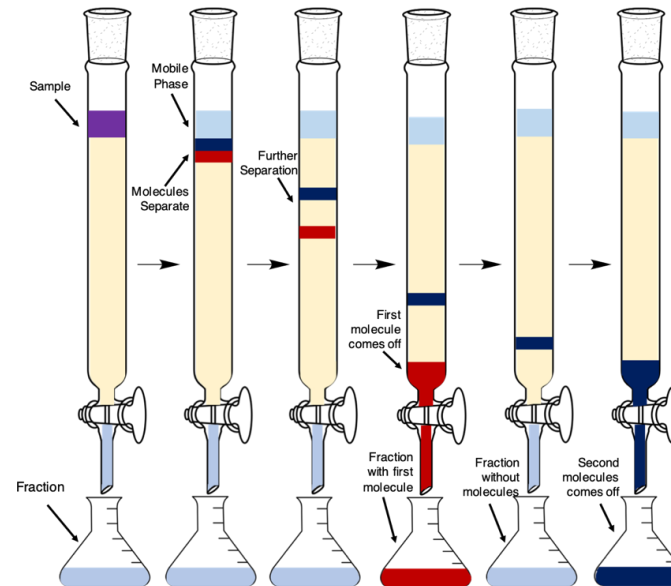
- **STAZIONARIA** (viene immobilizzata)
- **MOBILE** (scorre continuamente attraverso la fase stazionaria)

Il campione viene introdotto nella fase mobile e i componenti si distribuiscono tra le due fasi.

I componenti da separare hanno affinità diversa per le due fasi e tendono a separarsi con il procedere del processo cromatografico (differenti tempi di ritenzione)

Applicazioni:

- ✓ ISOLAMENTO DI UN COMPOSTO DA UN GREZZO DI REAZIONE
- ✓ SEPARAZIONE DI UN COMPONENTE DA UN ESTRATTO



Una specie chimica, depositata sulla fase stazionaria ed immessa nella corrente di fase mobile, si distribuirà dinamicamente tra le due fasi in misura proporzionale alla diversa affinità che possiede per esse



CROMATOGRAFIA SU COLONNA

TIPOLOGIE DI FASE STAZIONARIE:

- SOLIDE
- LIQUIDE

TIPOLOGIE DI FASE MOBILE:

- GAS
- LIQUIDE

Gas cromatografia:

Fase stazionaria: solida o liquida

Fase mobile: gas

Cromatografia in fase liquida

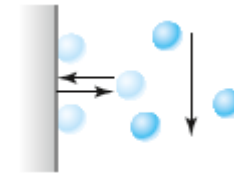
Fase stazionaria: solida o liquida/gel

Fase mobile: liquida

MECCANISMO DI SEPARAZIONE DEI COMPONENTI DELLA MISCELA:

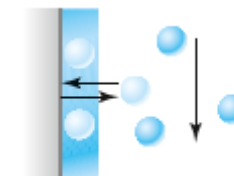
ADSORBIMENTO:

Fase stazionaria: **solida** (Gel di silice, Allumina, Kieselguhr),
Fase mobile: **liquida o gas**



RIPARTIZIONE

Fase stazionaria e mobile **sono liquide** (immiscibili).



Due tipologie di cromatografie di ripartizione: diretta e inversa.

Cromatografia di ripartizione **DIRETTA**: Fase stazionaria più POLARE della fase mobile

Cromatografia di ripartizione **INVERSA**: Fase stazionaria più APOLARE della fase mobile

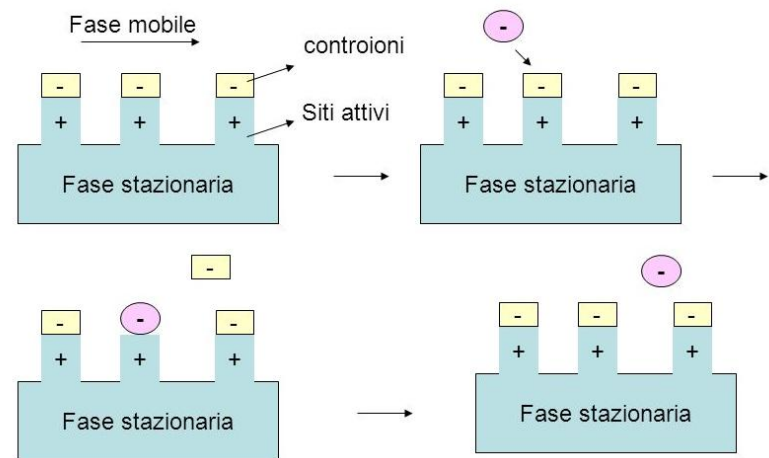
CROMATOGRAFIA SU COLONNA

MECCANISMO DI SEPARAZIONE DEI COMPONENTI DELLA MISCELA:

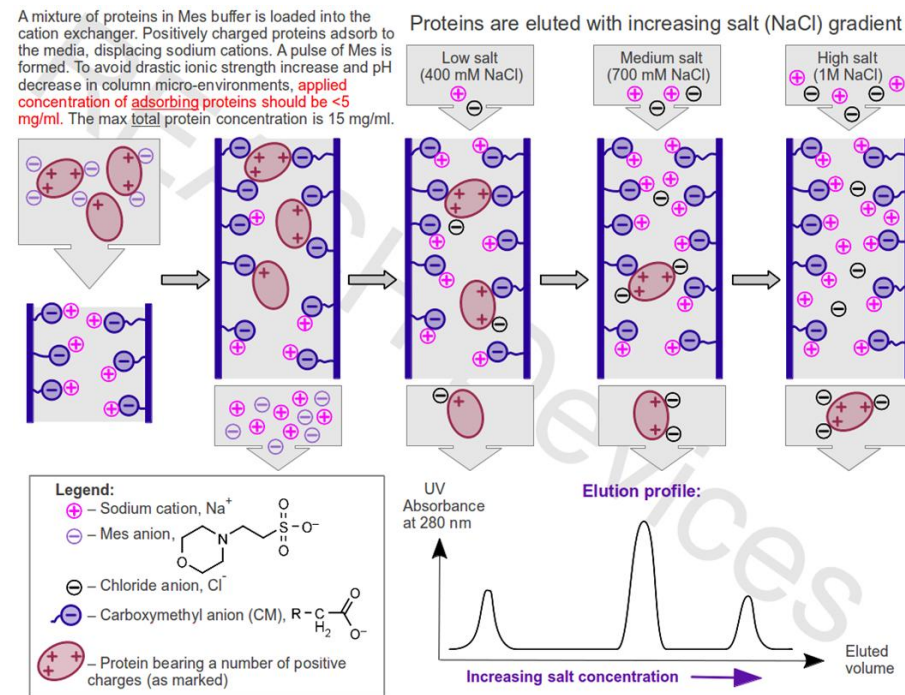
SCAMBIO IONICO

La **fase stazionaria** è costituita da un **polimero inerte contenente siti attivi ionizzati o ionizzabili**, i cui controioni possono essere scambiati con altri ioni aventi carica dello stesso segno.

La **fase mobile** è una **soluzione**, di solito acquosa, di sali neutri tampone, o un acido o una base più o meno diluiti



Cromatografia a scambio cationico		
Nome	Tipo di scambiatore	Struttura
Acido solfonico	Acido forte	Supporto-SO ₃ ⁻ H ⁺
Solfoetile (SE)	Acido forte	Supporto-O(CH ₂) ₂ SO ₃ ⁻ H ⁺
Solfopropile (SP)	Acido forte	Supporto-O(CH ₂) ₃ SO ₃ ⁻ H ⁺
Acido carbossilico	Acido debole	Supporto-COO ⁻ H ⁺
Carbossimetile	Acido debole	Supporto-OCH ₂ COO ⁻ H ⁺
Cromatografia a scambio anionico		
Nome	Tipo di scambiatore	Struttura
Ammonio quaternario	Base forte	Supporto-CH ₂ N(CH ₃) ₃ ⁺ Cl ⁻
Trietilaminoetile (TEAE)	Base forte	Supporto-O(CH ₂) ₂ N ⁺ (CH ₂ CH ₃) ₃ Cl ⁻
Dietil(2-idrossipropil)aminoetil (QAE)	Base forte	Supporto-O(CH ₂) ₂ N ⁺ (CH ₂ CH ₃) ₂ CH ₂ CHOHCH ₃ Cl ⁻
Dietilaminoetil (DEAE)	Base debole	Supporto-O(CH ₂) ₂ NH ⁺ Cl ⁻
p-Aminobenzil (PAB)	Base debole	Supporto-OCH ₂ -C ₆ H ₄ -NH ₃ ⁺ Cl ⁻

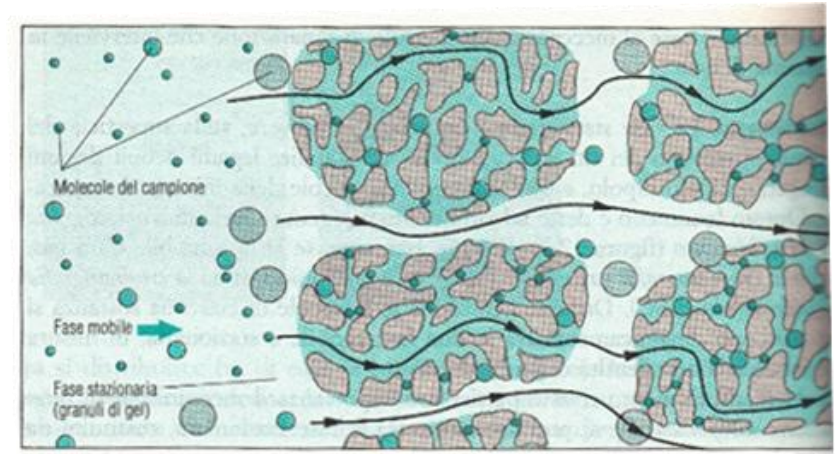
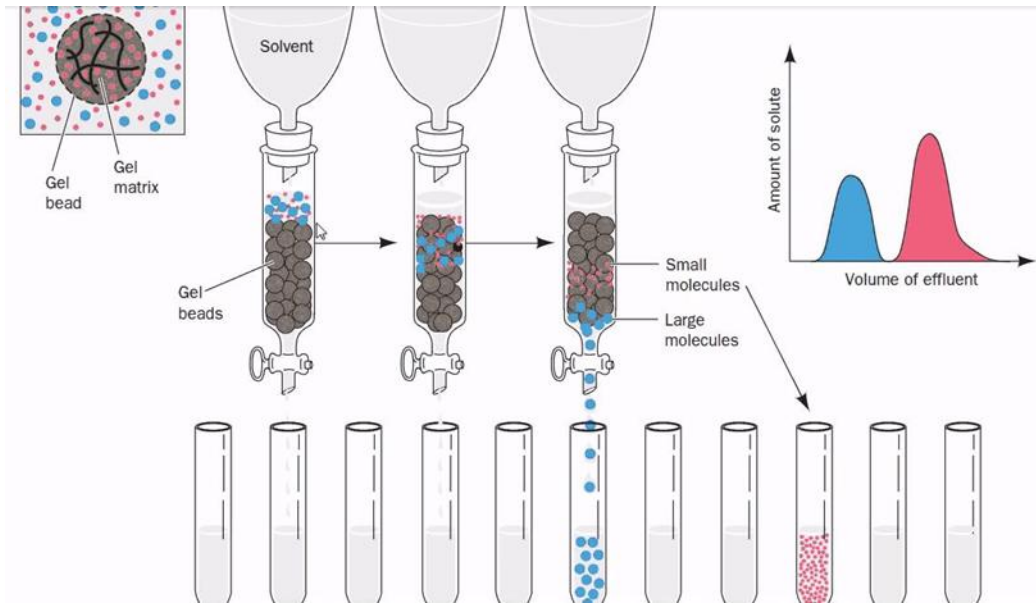


CROMATOGRAFIA SU COLONNA

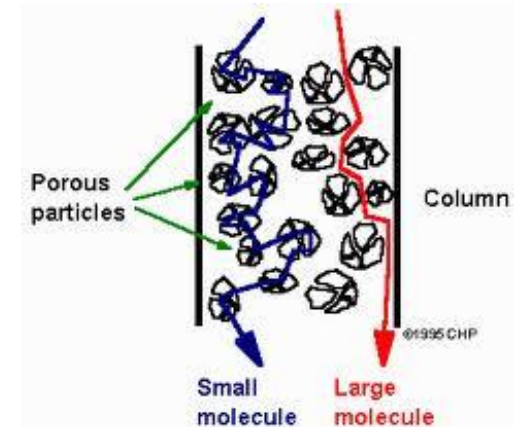
ESCLUSIONE

La **fase stazionaria** è, in genere, un **polimero allo stato di gel** caratterizzato da **pori** di dimensioni molto variabili.

La **fase mobile** può essere un **solvente** organico oppure acqua o una soluzione tampone



Separazione in base alle dimensioni molecolari (PM)



CROMATOGRAFIA SU COLONNA

MECCANISMO DI SEPARAZIONE DEI

COMPONENTI DELLA MISCELA:

ADSORBIMENTO:

Fase stazionaria solida POLARE
(Gel di silice, Allumina, Kieselguhr)

Fase mobile liquida



CROMATOGRAFIA
PER GRAVITÀ

Fase stazionaria
70-230 **MESH**

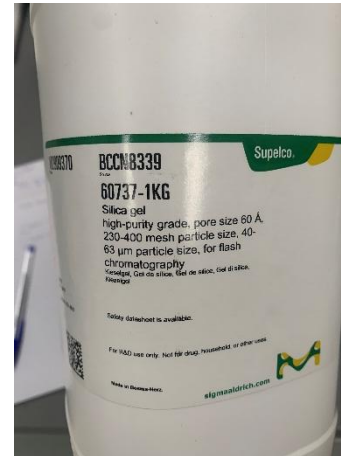


FLASH
CHROMATOGRAPHY

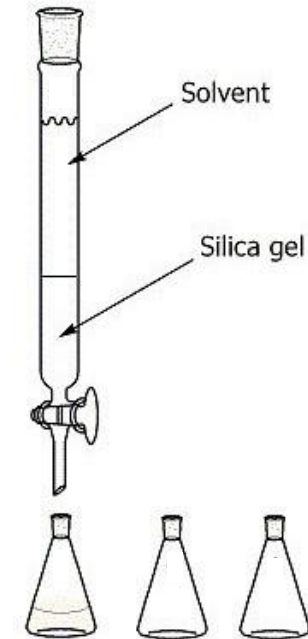
Fase stazionaria
230-400 **MESH**

Le **dimensioni dei granuli** vengono definite con il termine di **MESH**.

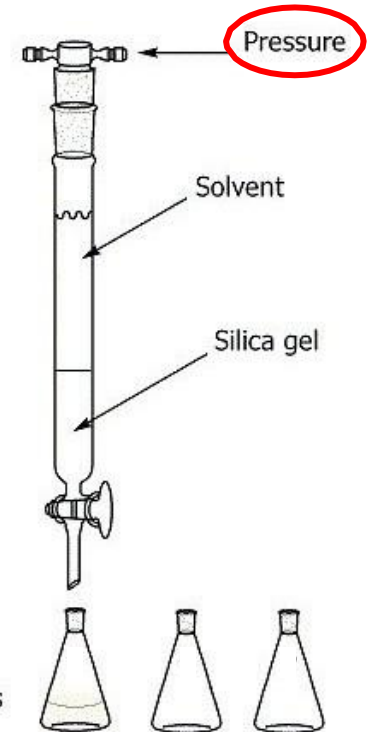
Più alto è il numero di **MESH**, tanto minore è il **diametro medio** delle particelle



CROMATOGRAFIA PER GRAVITÀ



FLASH CHROMATOGRAPHY



Riducendo le dimensioni della fase stazionaria il solvente defluirà con più fatica, sarà necessario applicare una certa pressione per far scorrere la fase mobile (**FLASH CHROMATOGRAPHY avviene sotto pressione con flusso di aria**)

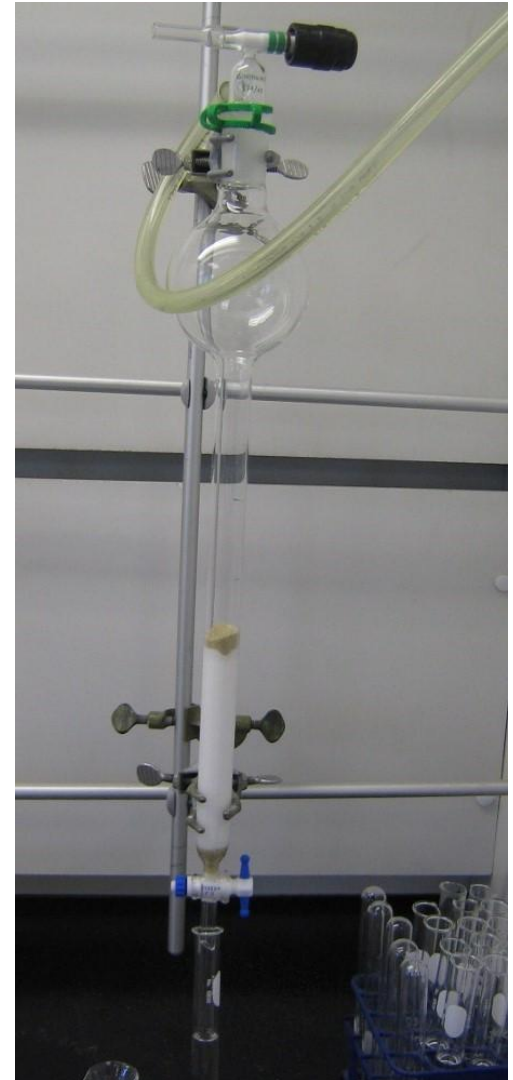
CROMATOGRAFIA SU COLONNA



FLASH CHROMATOGRAPHY:

Il solvente farà più fatica a percolare, **ma la separazione tra i prodotti sarà migliore perché saranno possibili più interazioni tra soluto e fase stazionaria.**

Occorrerà una maggiore pressione per fare scorrere la fase mobile attraverso la fase stazionaria



CROMATOGRAFIA SU COLONNA

SET-UP

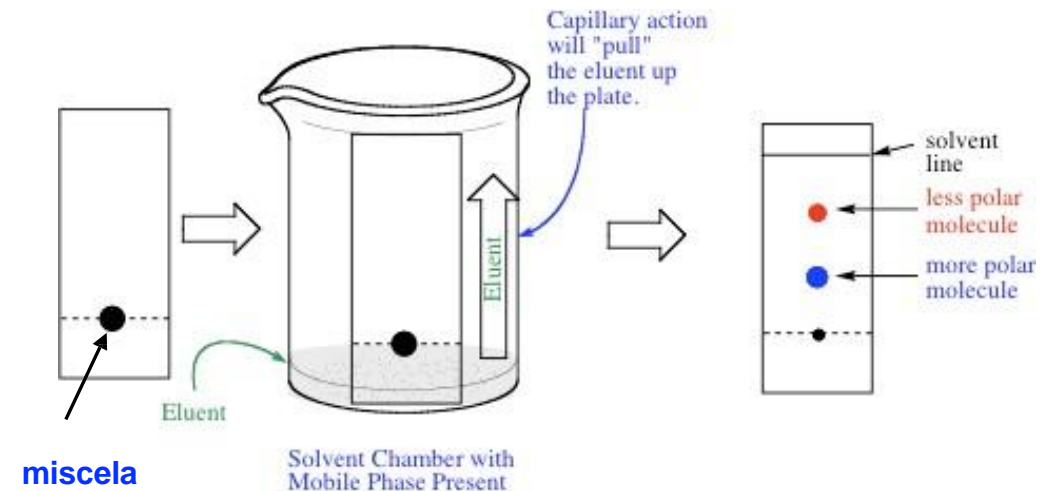
1. SELEZIONE DELLA FASE MOBILE

Si eseguono delle **TLC** analitiche per trovare un solvente o una miscela di solventi in cui il composto da purificare abbia all'incirca un **Rf** di 0.25-0.30 (non di più perché altrimenti il prodotto uscirebbe subito dalla colonna)

TLC: Thin Layer Chromatography

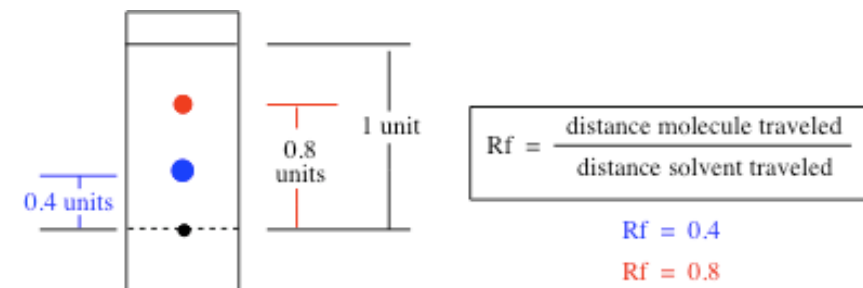
La cromatografia su strato sottile (TLC) è il metodo più comunemente usato per:

- Determinare qualitativamente la purezza di un composto
- Identificare un prodotto noto in una miscela
- Seguire e verificare l'andamento di una reazione chimica



Per capillarità il solvente sale sulla lastrina eluendo il composto organico. La diversa interazione del composto organico con il solvente e con la fase stazionaria (silice) determinerà una diversa velocità di eluizione e una diversa posizione della macchia relativa al composto sulla lastrina di silice, determinata misurando il **valore di Rf** che **per una definita miscela di eluente, è specifico per ogni sostanza organica**

(Rf = distanza percorsa dall'eluuto/distanza percorsa dal fronte dell'eluente, ratio to front)

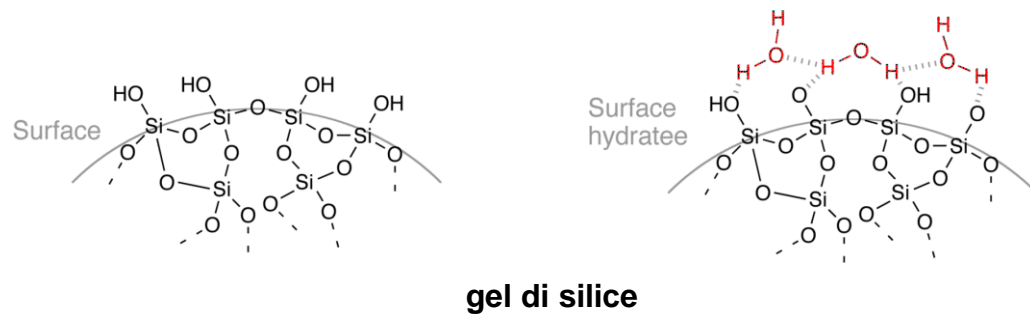


CROMATOGRAFIA SU COLONNA

TLC: Composizione lastra

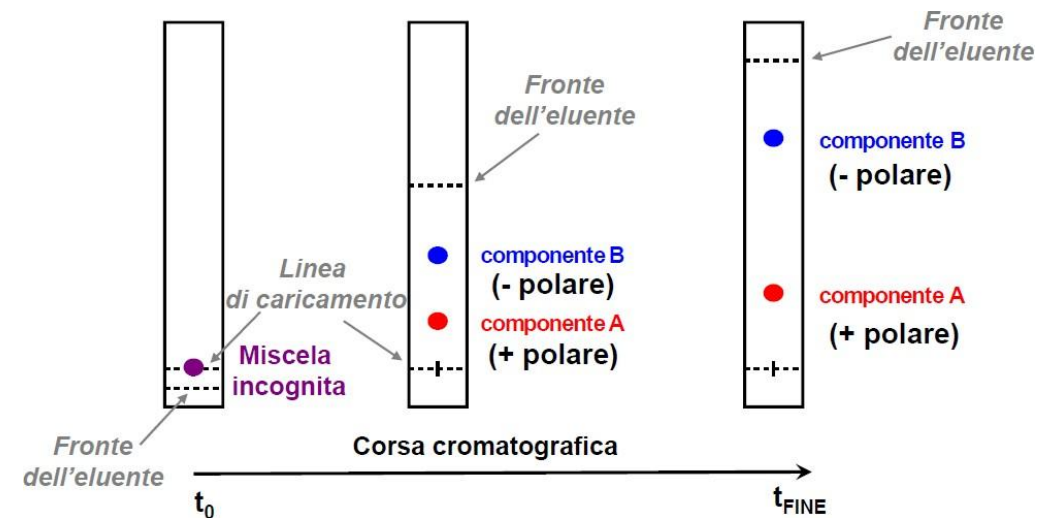
FASE STAZIONARIA:

- Composti lipofili (poco-medio polari): gel di silice, allumina, cellulosa acetilata, poliammidi
- Composti idrofili (molto polari, ionici): Kieselguhr, cellulosa modificata per scambio ionico, silice e poliammidi modificate



FASE MOBILE:

Vari solventi (o miscele di solventi)



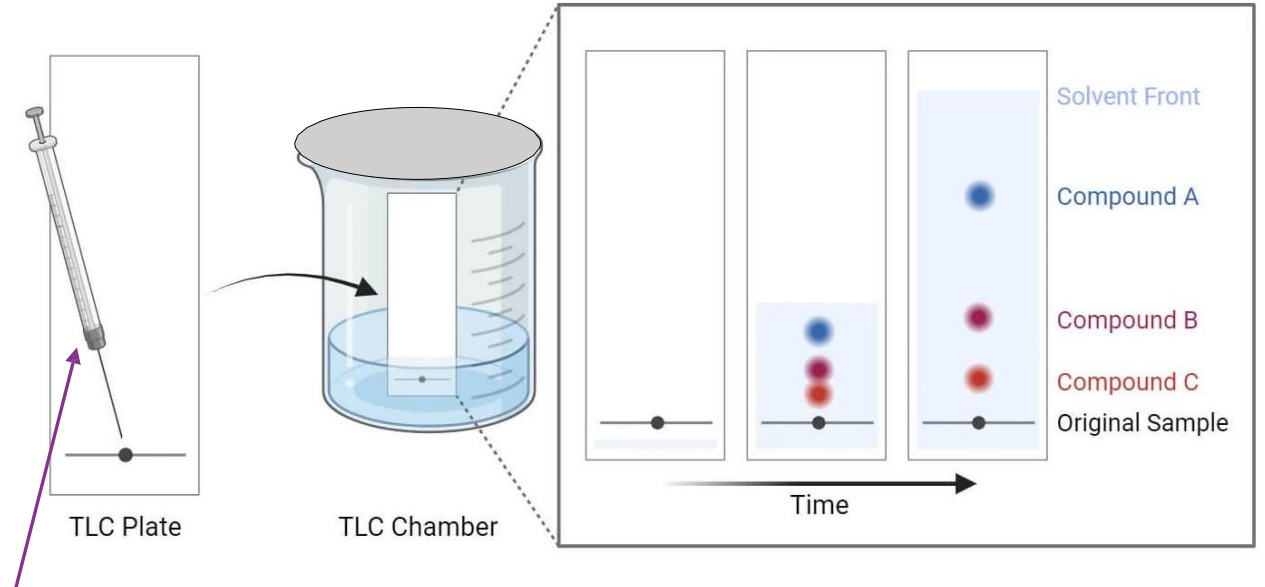
CROMATOGRAFIA SU COLONNA

TLC: separazione dei componenti di miscela

La TLC è una tecnica analitica cromatografica che sfrutta la diversa capacità dei composti di interagire con una fase stazionaria mentre sono trascinati da una fase mobile (solvente o miscela di solventi solubili tra loro) che sale per capillarità.



Camere di sviluppo/separazione



Si deposita la miscela da analizzare su TLC tramite capillare

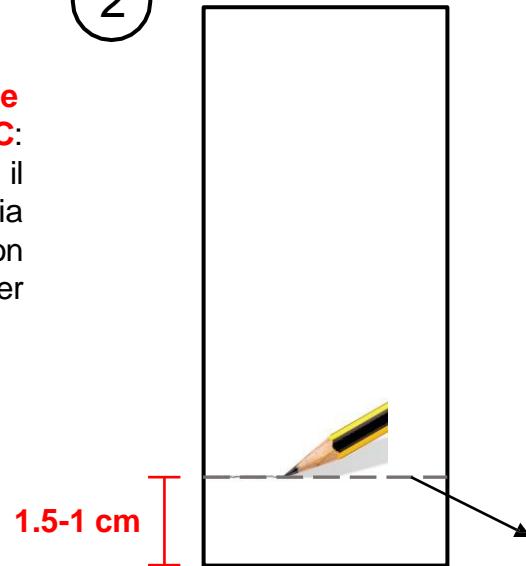
CROMATOGRAFIA SU COLONNA

TLC: preparazione lastrina

1

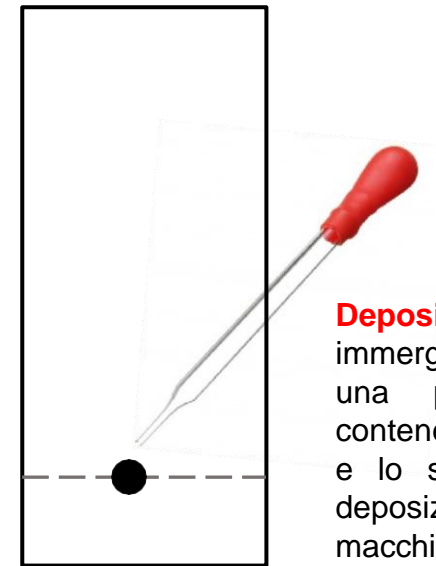
Sciogliere o diluire il campione da analizzare su TLC: aggiungere pochi mg se il campione è solido, o una goccia se è liquido, in una provetta con 1-2 ml del solvente scelto per l'analisi

2



Linea di deposizione: tracciare delicatamente con una matita una linea a circa 1-1.5 cm dal bordo inferiore

3

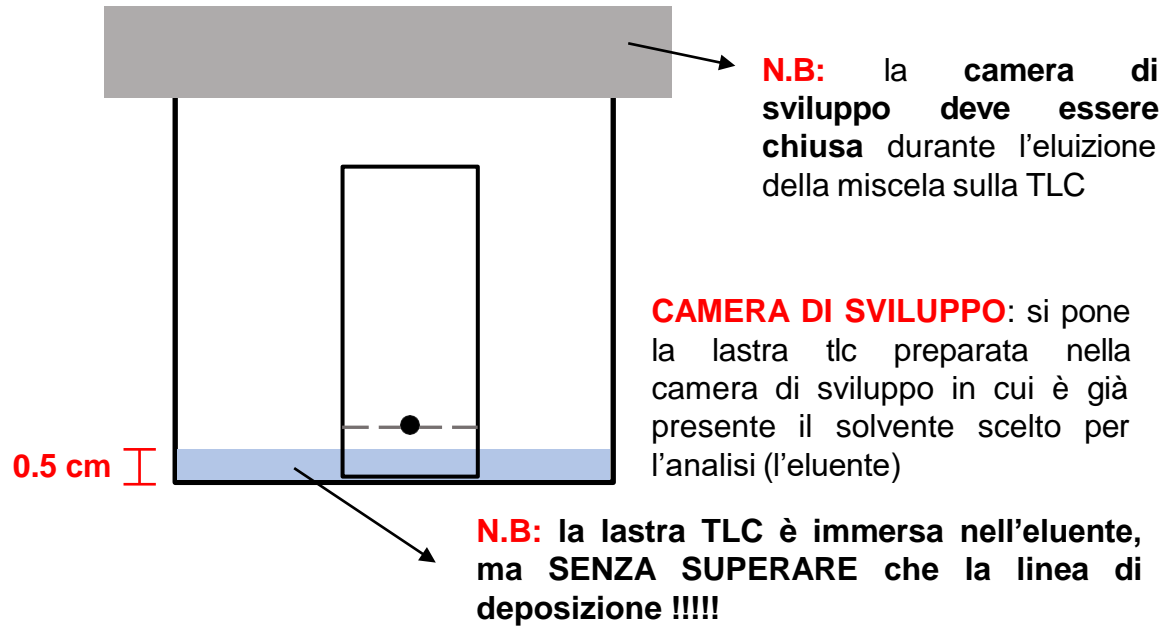


Depositare la miscela su TLC: si immerge un capillare o la punta di una pasteur nella soluzione contenete la miscela da analizzare e lo si appoggia sulla linea di deposizione, lasciando una piccola macchia

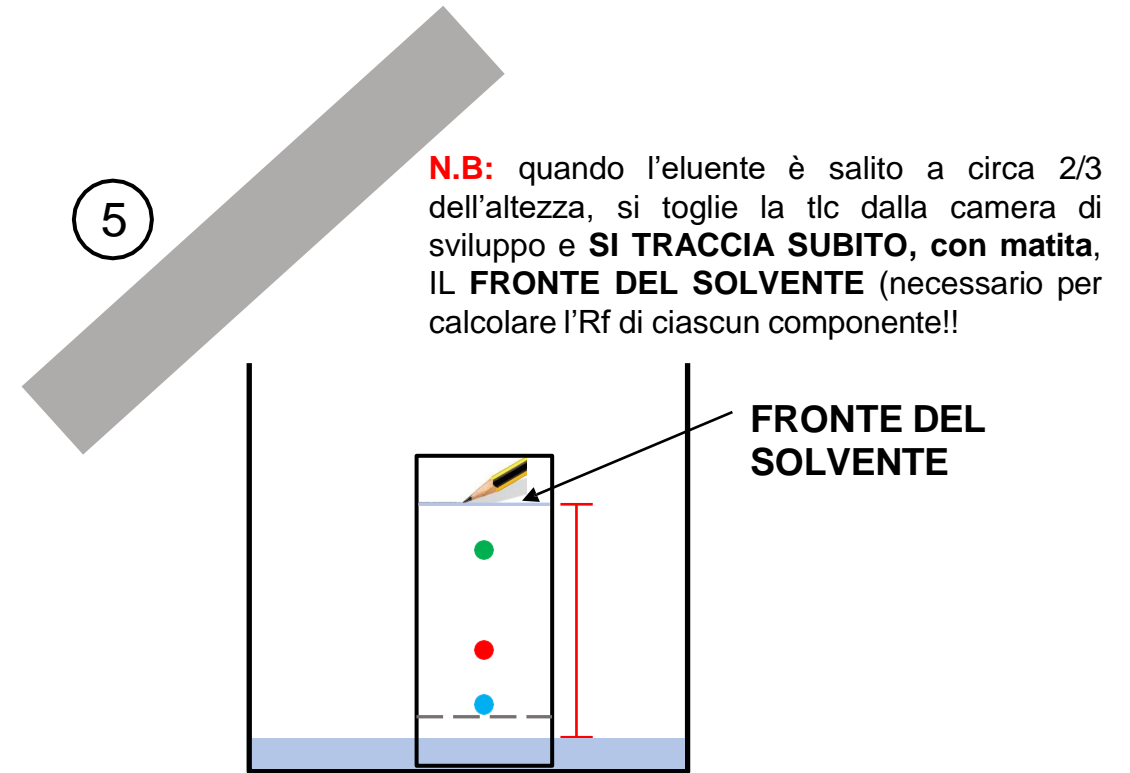
CROMATOGRAFIA SU COLONNA

TLC: procedimento

4

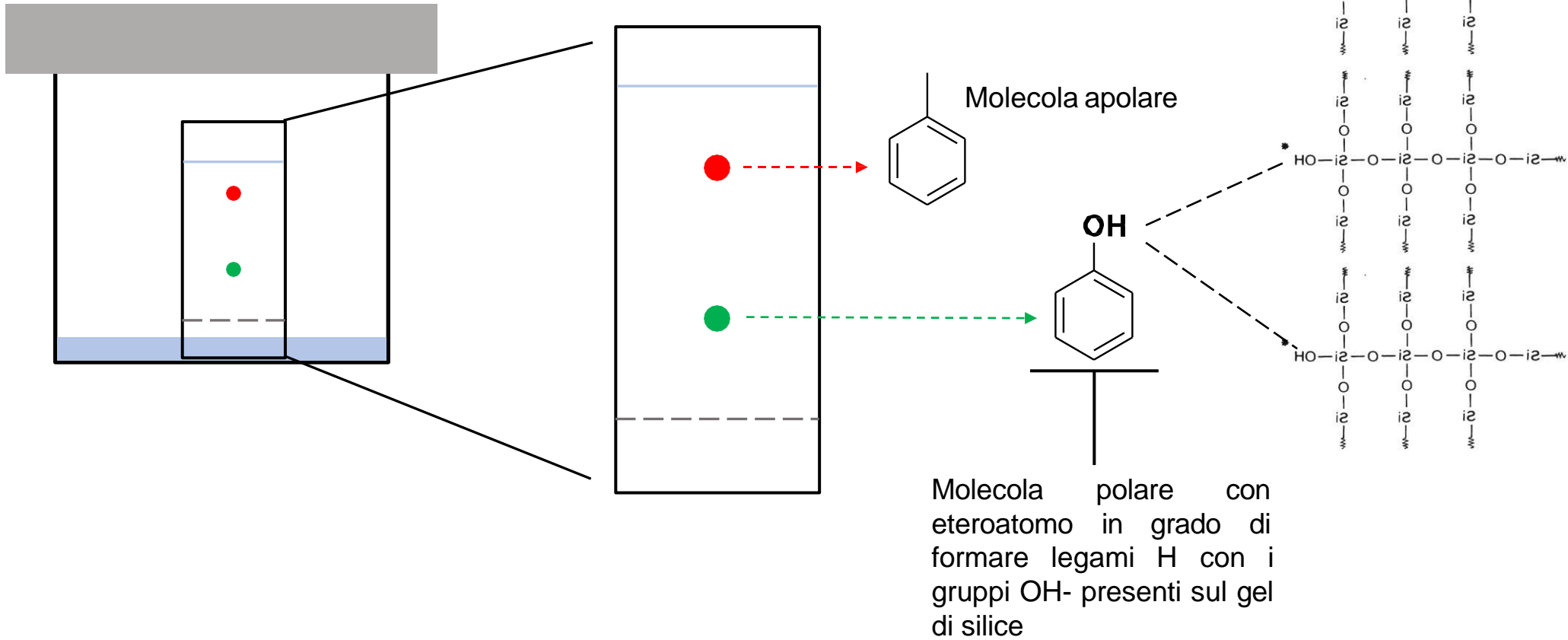


5



CROMATOGRAFIA SU COLONNA

TLC: eluizione dei component su lastra TLC



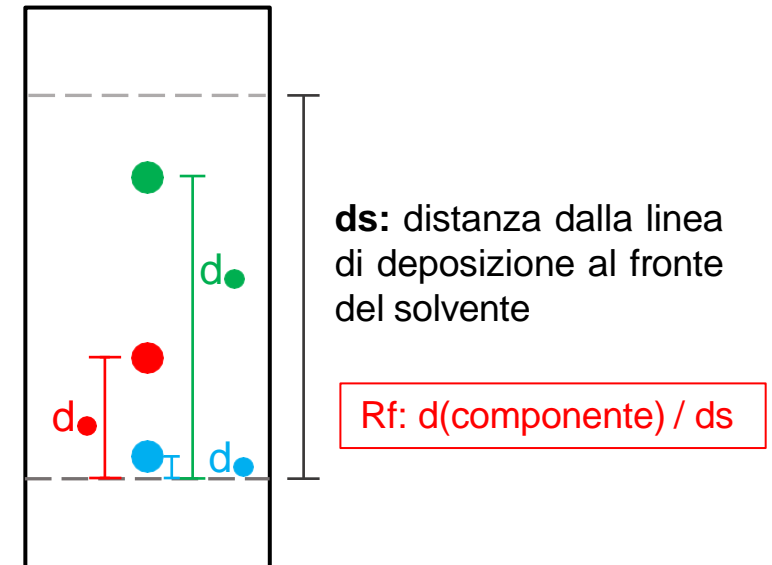
CROMATOGRAFIA SU COLONNA

TLC: identificazione macchie e calcolo Rf

6

Nel caso in cui le macchie di ciascun componente non siano visibili ad occhio, è necessario utilizzare **metodi di rilevazione/visualizzazione**. In caso contrario, si passa direttamente al calcolo del Rf

7



d: distanza percorsa dalla linea di deposizione al centro della macchia

CROMATOGRAFIA SU COLONNA

- **Composti che assorbono luce visibile:**
(*composti aromatici coniugati, polieni etc*)

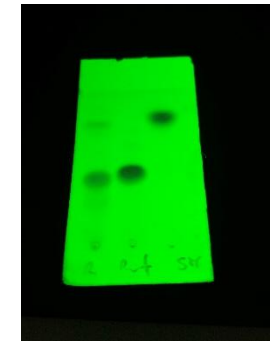
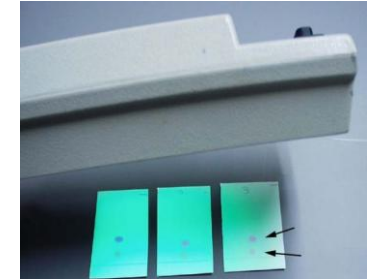


Occhio nudo; cerchiare con la matita ciascuna macchia

- **Composti che assorbono luce UV ($\lambda < 400$ nm):**
(*composti aromatici, dieni, nitroderivati, composti carbonilici e carbossilici coniugati, etc*)



LAMPADA UV;
cerchiare con la matita ciascuna macchia
In questo caso occorre utilizzare TLC trattate con fluorescente



- **Composti che non assorbono luce visibile né UV**



Immersione della tlc o vaporizzazione su tlc di reagenti chimici

- acido solforico per composti organici (spot neri)
- Iodio (I_2) per molecole contenenti doppi legami (spot bruni)
- $AgNO_3$ per alogenuri alchilici (spot neri)
- 2,4-dinitrofenil-idrazina per aldeidi e chetoni (spot arancioni)
- Ninidrina per amminoacidi + riscaldamento (spot rosso-violetti)
- Soluzione basica $KMnO_4$ + riscaldamento (spot gialli)

Composti che non assorbono luce né visibile né UV



Soluzione basica KMnO_4 +
riscaldamento (UNIVERSALE)

(spot gialli)

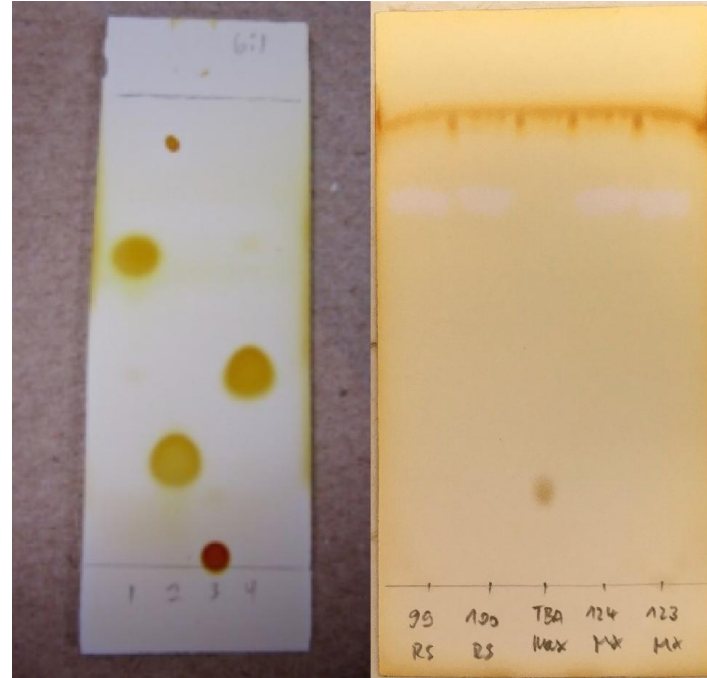
PER GRUPPI OSSIDABILI (alcheni,
alchini, alcoli, aldeidi, etc..)



Ninidrina

(spot rosa)

per amminoacidi e
ammine primarie



Iodio (I_2)

(spot bruni o bianchi)

per alcani (spot bianchi), tioli
alcheni, aromatici (spot bruni)



p-anisaldeide + riscaldamento

per alcoli (spot verdi), fenoli (spot
viola), ammine, aldeidi, chetoni (spot
blu o rossi)

1. SELEZIONE DELLA FASE MOBILE

Si eseguono delle TLC analitiche per trovare un solvente o una miscela di solventi in cui il composto da purificare abbia all'incirca un R_f di 0.25-0.30 (non di più perché altrimenti il prodotto uscirebbe subito dalla colonna)

2. SCELTA DELLA QUANTITA' DI SILICE DA UTILIZZARE

3. SCELTA DELLE DIMENSIONI DELLA COLONNA

La regola generale è che il **diametro della colonna** è direttamente **proporzionale alla quantità di sostanza da separare**, mentre la **lunghezza della colonna** è **inversamente proporzionale alla distanza tra le macchie da separare**.

4. CARICAMENTO/IMPACCAMENTO DELLA FASE STAZIONARIA (GEL DI SILICE)

- **Procedura a umido (preferibile):**



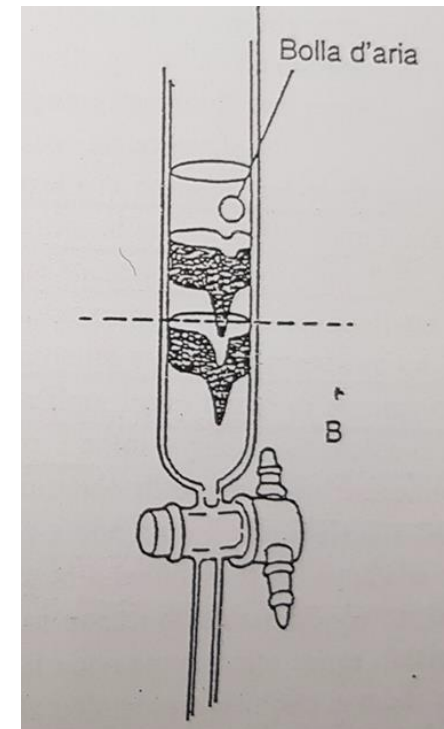
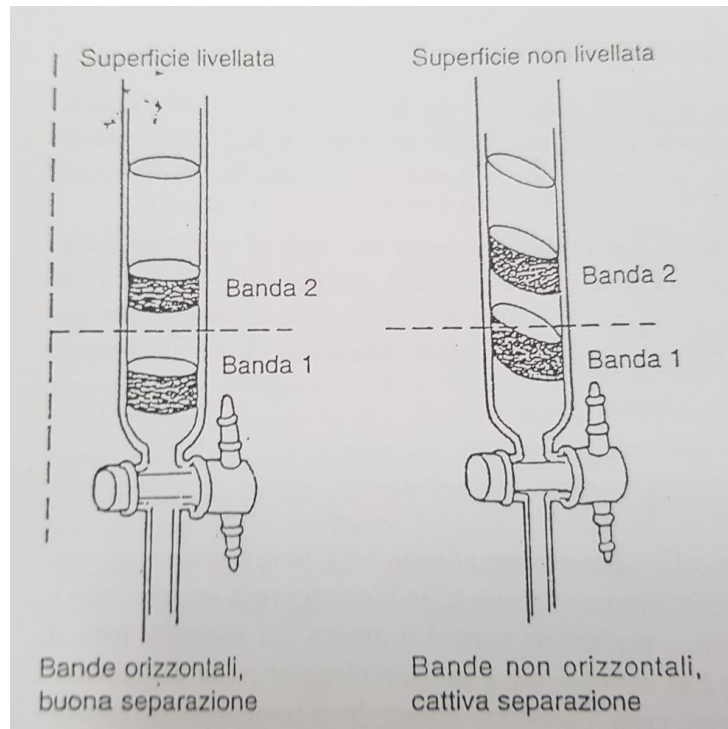
1. Si prepara una densa (ma fluida!!) sospensione di fase stazionaria nella fase mobile in quantità adeguata (beuta o pallone). Tenere in considerazione che la solvatazione della fase stazionaria sviluppa calore.
2. Si trasferisce il tutto in colonna mediante imbuto a coda larga, facendo attenzione ad avere un riempimento uniforme e tenendo il rubinetto aperto. Picchiettare durante la fase di caricamento aiuta a eliminare bolle di aria rimaste intrappolate nella fase stazionaria.

- **Procedura a secco:** si può mettere la silice a secco all'interno della colonna, per poi introdurre il solvente.

4. CARICAMENTO/IMPACCAMENTO DELLA FASE STAZIONARIA (GEL DI SILICE)

- **Procedura a umido (preferibile):**

1. Si prepara una densa (ma fluida!!) sospensione di fase stazionaria nella fase mobile in quantità adeguata (beuta o pallone). Tenere in considerazione che la solvatazione della fase stazionaria sviluppa calore.
2. Si trasferisce il tutto in colonna mediante imbuto a coda larga, facendo attenzione ad avere un riempimento uniforme e tenendo il rubinetto aperto. Picchiettare durante la fase di caricamento aiuta a eliminare bolle di aria rimaste intrappolate nella fase stazionaria.



5. PREPARAZIONE DELLA MISCELA DA PURIFICARE

- E' preferibile non caricare miscele solide direttamente.
- **L'ideale consiste nello sciogliere il campione nella minima quantità di fase mobile.** Se si utilizzassero altri solventi, questi modificherebbero la polarità della fase mobile e il comportamento del prodotto nella colonna sarebbe diverso da quello della TLC iniziale.
- Una valida alternativa consiste nello sciogliere il campione nella minima quantità di cloruro di metilene.
- In caso il campione fosse insolubile nella fase mobile o in cloruro di metilene si può procedere a quello che viene definito **adsorbimento su silice**: sciogliere la miscela in un solvente volatile, aggiungere la minima quantità di silice per ottenere un solido polveroso dopo rimozione all'evaporatore rotante (rotavapor) del solvente; la polvere ottenuta andrà caricata in colonna (carica a secco).
- In caso di miscele liquide oleose poco viscoso si può procedere a caricandole come tali. Un olio viscoso invece deve essere diluito

6. CARICAMENTO DELLA MISCELA DA PURIFICARE

Si depone quindi la soluzione in testa alla colonna mediante pipetta pasteur, facendo attenzione a non smuovere la silice. Il solvente (fase mobile) deve essere allo stesso livello della silice.

7. ELUIZIONE

Si comincia ad eluire dopo aver riempito la restante parte della colonna con l'eluente raccogliendo dapprima il volume morto quindi **le varie frazioni che vanno analizzate tramite TLC**. Attenzione al flusso. Il volume di ogni frazione è un parametro importante da selezionare per una corretta ed efficace separazione dei componenti la miscela da separare.

CROMATOGRAFIA SU COLONNA

SET-UP COLONNA

- ① Scelta colonna - inserimento ovatta - aggancio



- ② Impaccamento ad umido



Rubinetto **APERTO** durante l'**impaccamento** (inserire una beuta o beaker sotto il rubinetto per recuperare l'eluente)
Quando il livello dell'eluente è uguale al livello della fase stazionaria **CHIUDERE** il rubinetto

CROMATOGRAFIA SU COLONNA

SET-UP COLONNA

- ③ Caricamento della miscela da purificare



**dissolve mixture in as
little solvent as possible**

- ④ Eluizione

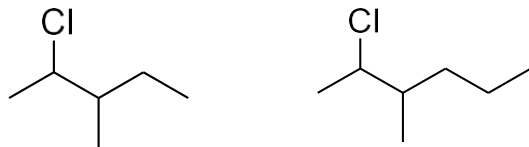


[【4K】 -- Column Chromatography \(Purification\) 🌟](#)

https://www.youtube.com/watch?v=Jr_ylwvxcQg&ab_channel=ProfessorDaveExplains

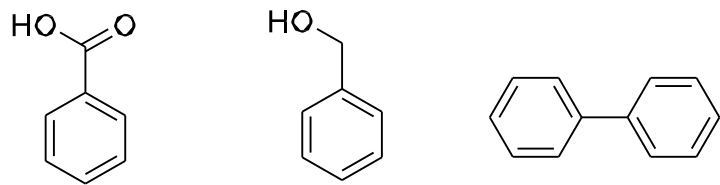
Collegamento al video

A)



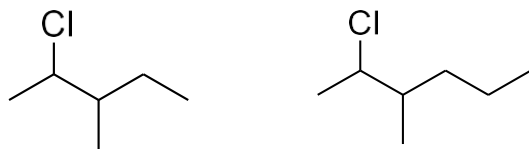
Tempo di ritenzione minore:

B)

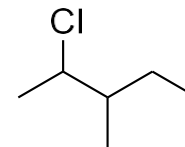


Tempo di ritenzione in ordine crescente:

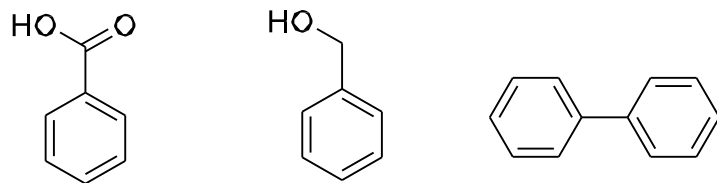
A)



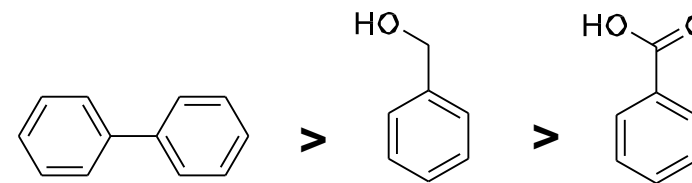
Tempo di ritenzione minore:



B)



Tempo di ritenzione in ordine crescente:



CROMATOGRAFIA SU COLONNA

Scolonnatore automatico



HPLC

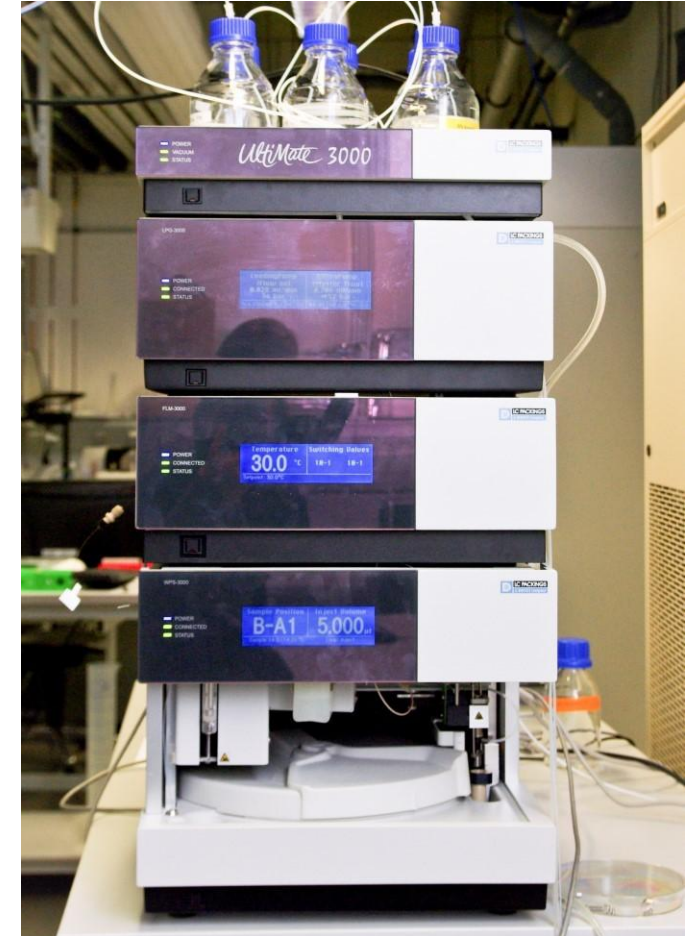
High Performance Liquid Chromatography

La **cromatografia liquida ad alta prestazione** (in inglese *High Performance Liquid Chromatography*) è un tipo di **cromatografia liquida**

ALTA PRESTAZIONE

CARATTERISTICHE

- ✓ Solido di supporto con diametro molto piccolo (2-10 μm)
- ✓ Colonne con diametro tra 2-5 mm
- ✓ Pressioni di ingresso elevate
- ✓ Precisione dell'introduzione del campione
- ✓ Portata della fase mobile controllata

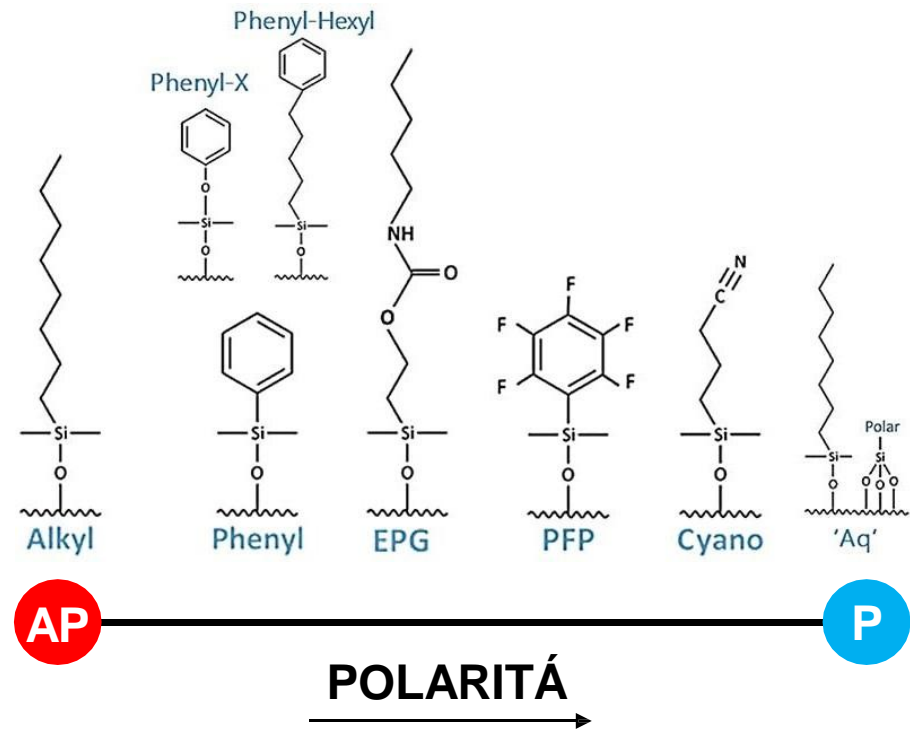


HPLC

- FASE STAZIONARIA:**

È oggi (la più comune) costituita da una fase stabile liquida chimicamente legata al supporto, detta **bonded phase (BP)**.

Il **supporto** (o matrice) è generalmente costituito da silice: i gruppi OH della silice vengono utilizzati per legare chimicamente la fase stazionaria. Diametro supporto 2-10 μm : in tal modo viene aumentata la superficie di contatto fra fase mobile e fase stazionaria



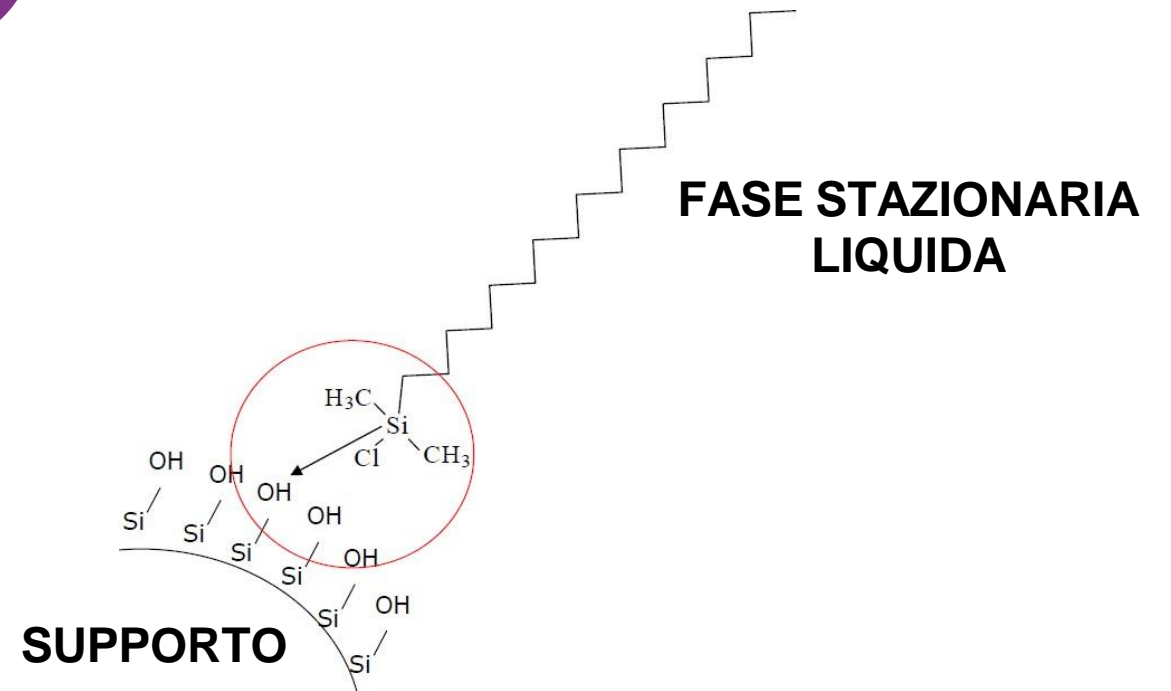
Le fasi legate possono essere **polari** (ad es. con un ammino gruppo o un ciano gruppo), utilizzate in fase normale; oppure **apolari** (ad es. con una catena alchilica, usate in fase inversa

HPLC

- FASE STAZIONARIA:
DERIVATIZZAZIONE DELLA SILICE**

La fase stazionaria liquida viene legata ai silanoli della silice per reazione con un silano contenente un gruppo reattivo (es. cloro).

L'atomo di silicio è legato alla molecola della fase desiderata (qui mostrata come C18 o octadecil) e a due piccoli gruppi laterali come il metile.



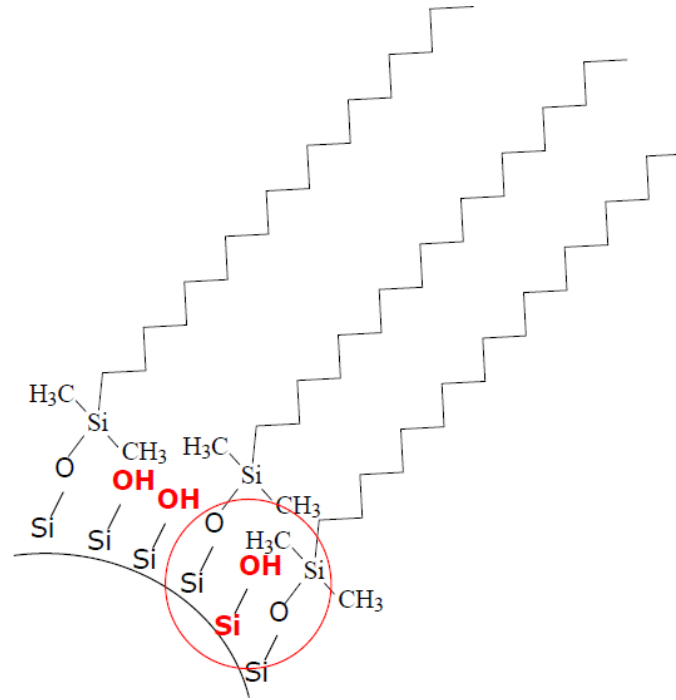
- **FASE STAZIONARIA:
DERIVATIZZAZIONE DELLA SILICE**

Molti dei silanoli superficiali non reagiscono a causa dell'ingombro sterico.

I silanoli che non reagiscono sono spesso chiamati "silanoli liberi".

Questo fenomeno è tanto più rilevante quanto maggiore è l'ingombro del legante (es. C18).

Il grado di ricopertura, espresso in $\mu\text{mol}/\text{m}^2$, è una misura della densità di fase sulla superficie della particella.



HPLC

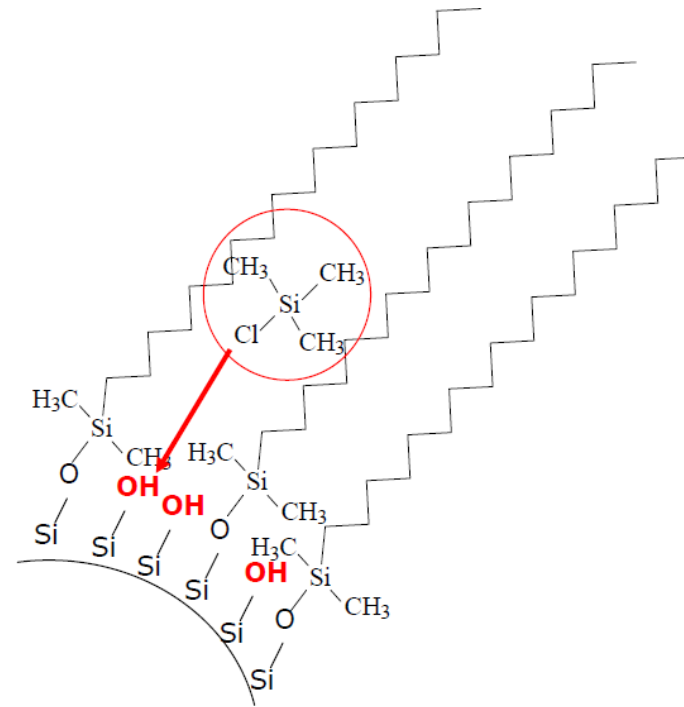
- **FASE STAZIONARIA:
DERIVATIZZAZIONE DELLA SILICE**

I silanoli liberi sono disponibili per altre interazioni con le molecole di soluto, spesso **indesiderate** (sono causa dei picchi scodati).

Viene quindi spesso effettuato un processo di "**end-capping**" utilizzando un silano di piccole dimensioni che si lega ai silanoli liberi.

Piccoli silani come il trimetilclorosilano sono in grado di accedere a molti dei silanoli liberi rimasti dopo il legame della fase stazionaria.

Il processo di end-capping rende i silanoli inaccessibili alle molecole di soluto



- **FASE MOBILE:**

Le fasi mobili (o eluenti) in HPLC sono solventi puri o miscele di due o più solventi che con il campione passano attraverso la colonna spinti da grandi pressioni.

Spesso è necessario utilizzare una miscela di due o più solventi per ottenere la fase mobile di composizione ottimale.

Durante l'analisi è possibile effettuare **un'eluizione isocratica** (mantenendo costante la composizione della fase mobile) o **un'eluizione in gradiente** (la composizione della fase mobile varia durante l'analisi).

L'eluizione in gradiente viene utilizzata quando la miscela di analiti comprende composti di caratteristiche molto diverse tra loro e serve per **migliorare la separazione e ridurre i tempi di analisi.**

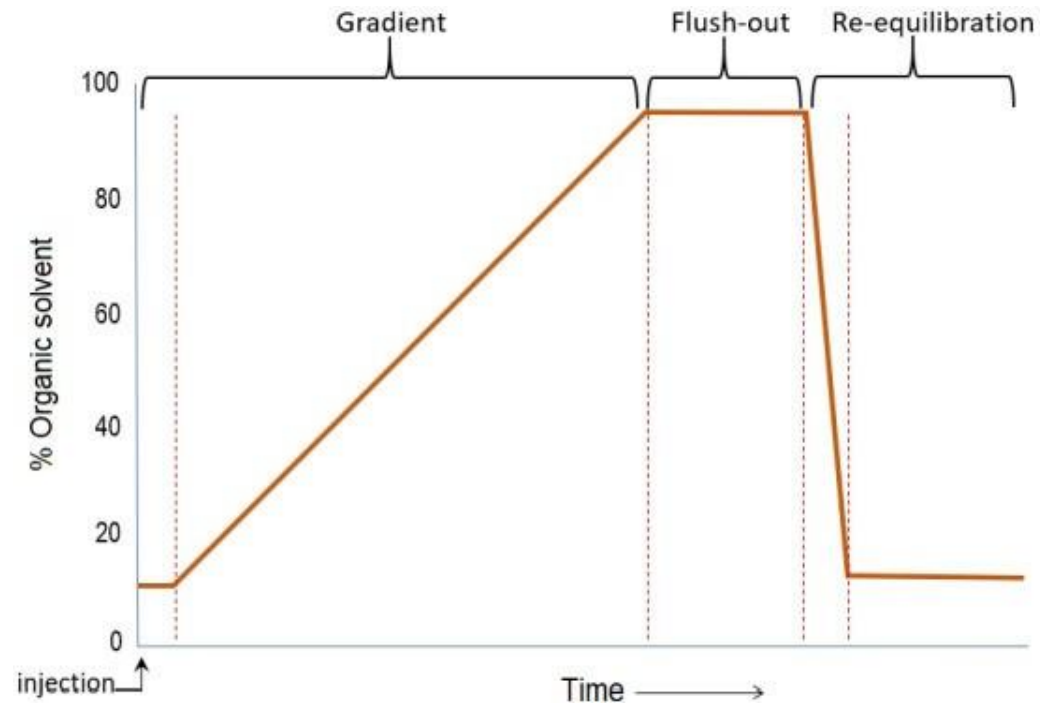
HPLC

- **FASE MOBILE: ELUIZIONE IN GRADIENTE**

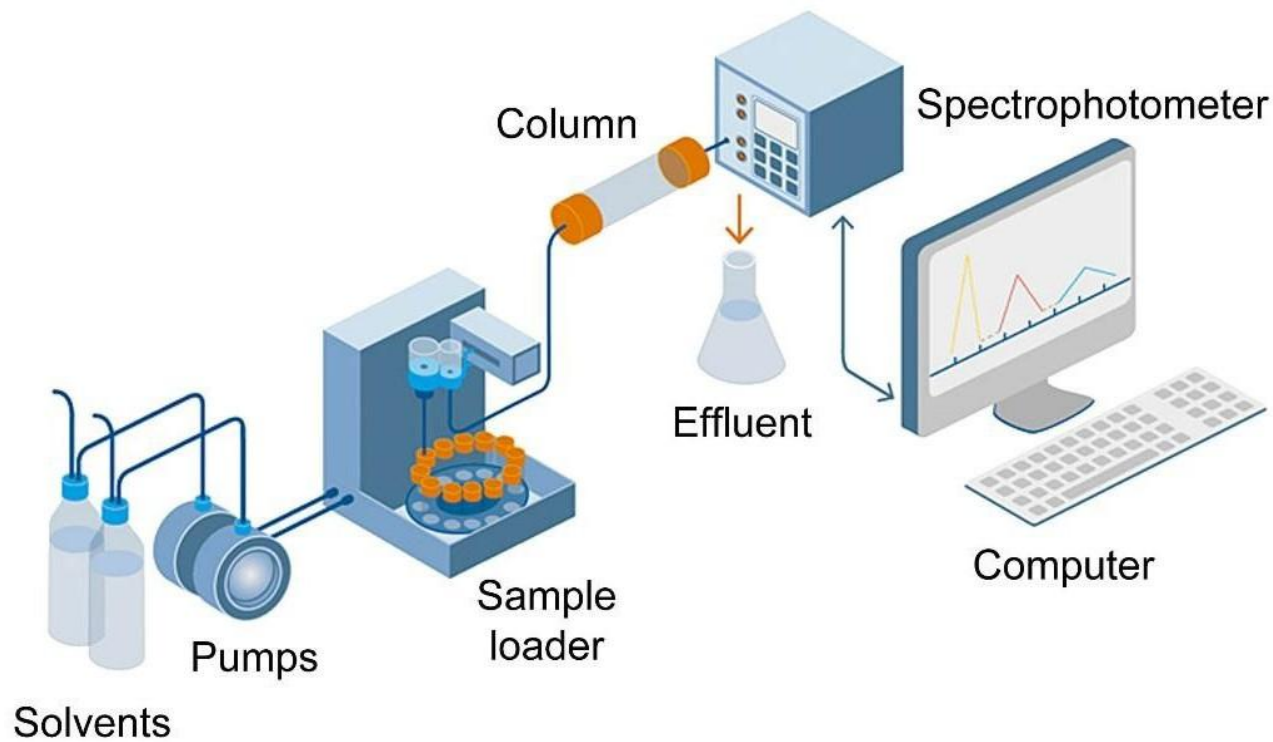
Si **aumenta progressivamente la percentuale del/dei solventi organici** (meno polari) mescolati all'acqua nella fase mobile.

Si possono creare gradienti di eluizione anche con quattro diversi solventi, inoltre il gradiente può essere non lineare

L'incremento non lineare del solvente organico (B) può consentire di separare meglio picchi non ben separati con un gradiente lineare



HPLC

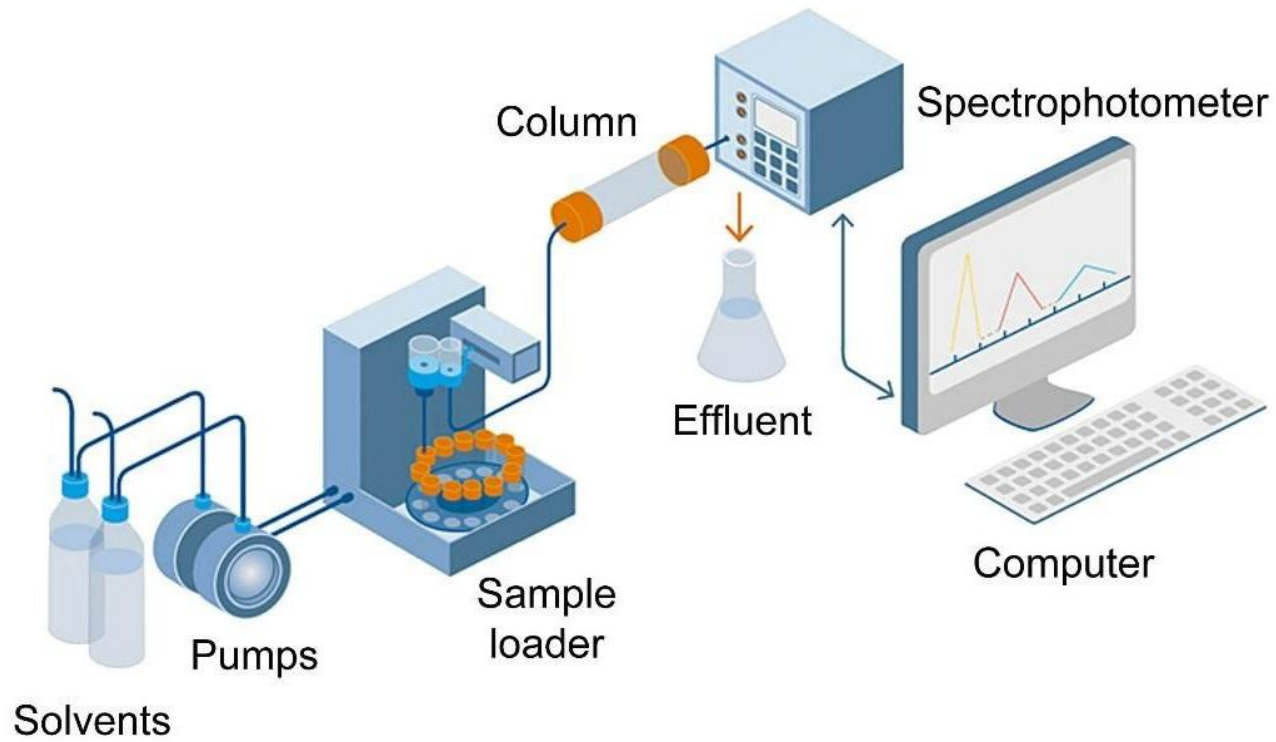


Nella moderna cromatografia liquida, sono richieste **pressioni di pompaggio di diverse centinaia di atmosfere**, per **raggiungere velocità di flusso sufficienti a permettere una buona separazione in colonne impaccate con particelle di diametro variabile dai 3 ai 10 μm** .

Come conseguenza l'equipaggiamento di una moderna apparecchiatura per HPLC è notevolmente più costoso rispetto a quello della cromatografia classica

Esistono anche strumentazioni in grado di raggiungere **1200-1500 bar** (Ultra High Performance Liquid Chromatography, UHPLC)

HPLC



- **Contenitori per la fase mobile**
- **Pompe**
- **Sistemi di introduzione del campione**
- **Colonna**
- **Rivelatori**

HPLC

(A)



(B)



POMPE

Consentono il flusso dell'eluente e del campione all'interno del sistema.

Vengono utilizzate:

- pompe **meccaniche a pistone (A)**
- pompe **meccaniche a siringa (B)**
- pompe **pneumatiche (C)**

(C)



Tutte devono fornire un **flusso costante e riproducibile.**

HPLC



INIEZIONE DEL CAMPIONE

- **MANUALE**

- **AUTOMATICA (AUTOCAMPIONATORE)**

Per procedere all'analisi si mettono le vials su un apposito "vassoio" in ordine progressivo e poi si imposta la sequenza di lavoro al pc, che non è altro che l'ordine che la macchina seguirà per iniettarle in colonna oltre che alla quantità di ogni prelievo effettuato.

E' formato da un apposito braccio meccanico che preleva dal vassoio la vialle con un ago molto sottile ne estrae il contenuto e lo immette nello strumento.



HPLC

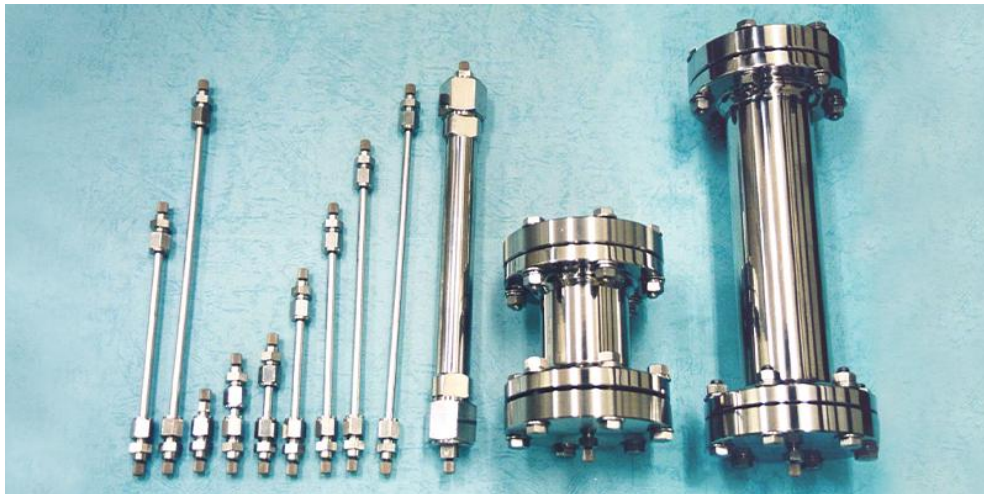
COLONNE

Sono la parte del sistema in cui il campione viene effettivamente separato. Gli analiti possono raggiungere diverse velocità di eluizione, in base all'interazione con la fase stazionaria contenuta nella colonna e con l'eluente.

3 modalità operative: **HPLC analitica**, **HPLC semi-preparativa**, **HPLC preparativa**

Opzione dimensione di ciascuna colonna

Funzione	HPLC preparativa	HPLC semipreparativa	HPLC analitica
Definizione	Purificazione su larga scala	Purificazione su media scala	Analisi dei componenti della miscela
Dimensioni della colonna (diametro interno x lunghezza)	21.2 mm – 50 mm x 250 mm – 1000 mm	10.0 mm – 21.2 mm x 150 mm – 500 mm	2.1 mm – 4.6 mm x 100 mm – 250 mm
Applicazioni	Isolamento e purificazione su larga scala	Purificazioni moderate	Analisi e identificazione
Portate e consumo di solvente	Alta	Adeguate	Basso



HPLC

RIVELATORE

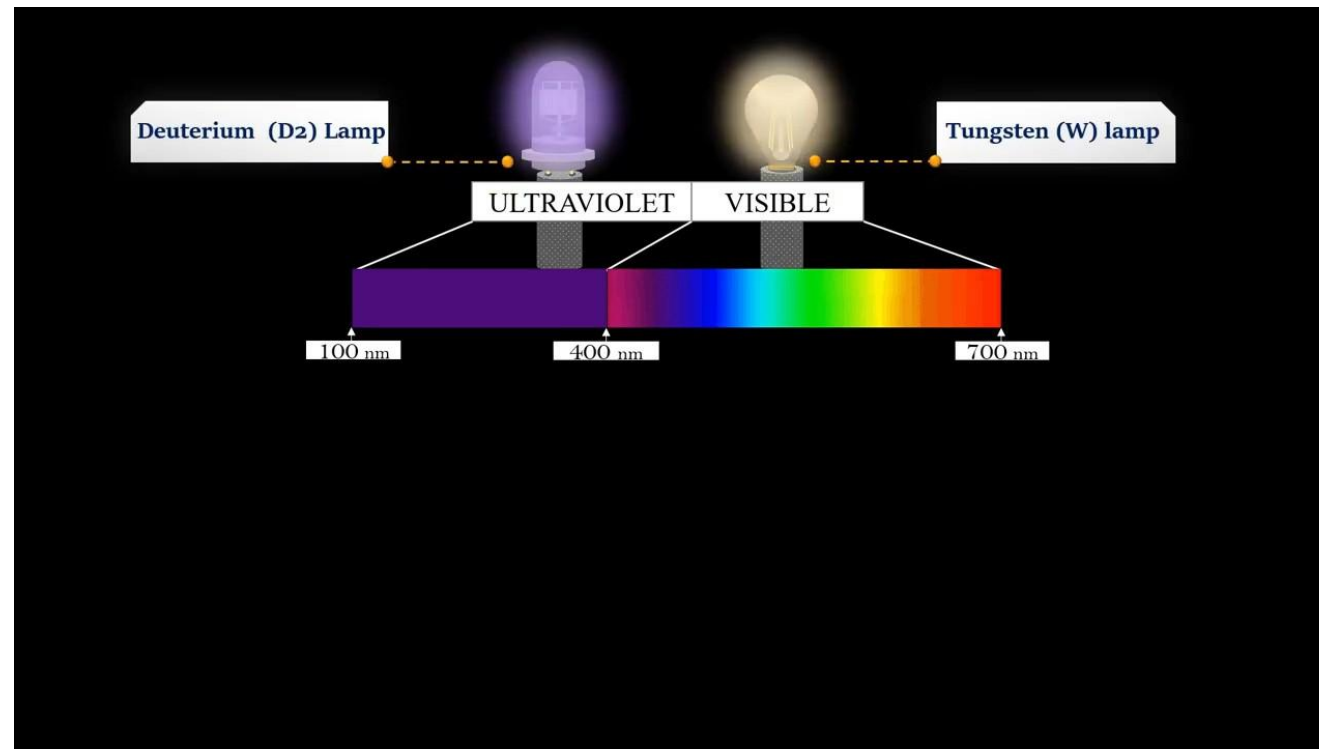
Rivelatore	Caratteristiche
Assorbanza (UV/Vis)	Il più comune rivelatore per composti che assorbono in UV/Vis. Buona sensibilità (ng)
Diode array	Aiuta identificazione dell'analita attraverso dati spettrali
Fluorescenza (FI)	Rivelatore specifico con grande sensibilità (pg)
Indice rifrazione (RI)	Universale, usato per composti senza cromoforo Polimeri, zuccheri, trigliceridi, acidi organici
Spettr. di massa (MS)	Eccellente sensibilità (fg) e specificità, definitiva identificazione di analiti
Elettrochimico	Per composti elettroattivi
Conducibilità	Per composti ionici
Radioattività	Specifico per composti marcati

- UV-Vis
- UV a serie di diodi (**più comune**)

- Spettrometro di massa

HPLC

RIVELATORE UV-Vis



<https://www.youtube.com/watch?v=eCj0cRtJvJg>

MATERIALE DIDATTICO

- **L. Costantino, D. Barlocco «Laboratorio di preparazione estrattiva e sintetica dei farmaci»- (ARACNE)**
- **D'Ischia-'La chimica organica in laboratorio'-PICCIN**