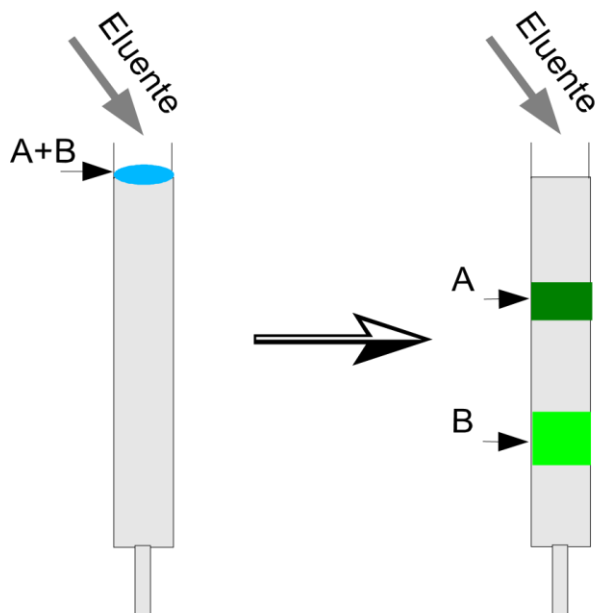


1.1 Introduzione

La cromatografia é una tecnica di separazione di vari componenti di una miscela, al pari di una distillazione frazionata, di una cristallizzazione e una estrazione con solvente.

Fu ideata nel 1906 dal russo Tswett.

La tecnica sperimentale, su una soluzione di clorofille, evidenziò la separazione dei vari pigmenti utilizzando una colonna impaccata con carbonato di calcio, ed eluendo con etere di petrolio, dando luogo alla formazione di strati di diverso colore (da cui il nome: 'cromos'-colore).



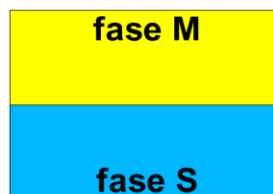
La tecnica cromatografica consiste nello sfruttare in modo particolarmente efficiente la diversa attitudine che ogni molecola o ione possiede nel distribuirsi tra due differenti fasi (una stazionaria e una mobile).

Nel caso della tecnica di estrazione con solvente, per ottenere un'efficiente separazione, può essere necessario un numero molto elevato di estrazioni separate, con relativi problemi di perdita di campione e impossibilità di operare con microcampioni.

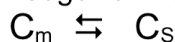
Se invece una fase viene immobilizzata (fase stazionaria) e l'altra (fase mobile, o 'eluente') viene fatta scorrere sopra di essa, é possibile condurre l'estrazione in modo continuo. Una specie chimica depositata sulla fase stazionaria e immessa nella corrente di fase mobile si distribuirà infatti dinamicamente tra le due fasi, in misura proporzionale alla diversa affinità che possiede per esse.

La fase stazionaria può essere costituita da un solido o da un liquido opportunamente supportato, mentre la fase mobile é costituita da un fluido (gas o liquido) che contiene i componenti da separare e che si muove sopra quella stazionaria.

*Consideriamo un sistema formato da due fasi in cui viene introdotta una sostanza: **la sostanza si distribuirà fra le due fasi a seconda delle sue particolari proprietà chimico-fisiche.***



Indicando con C_m e C_s le sue concentrazioni nella fase mobile e nella fase stazionaria rispettivamente, e supponendo che le condizioni sperimentali siano tali da conseguire il raggiungimento di equilibri successivi del tipo:



possiamo rappresentare con K la corrispondente costante di equilibrio: $K = C_s / C_m$

K prende il nome di coefficiente di distribuzione.

E' dal valore di K che dipende il tempo di ritenzione, cioè il tempo che occorre per percorrere l'intera fase stazionaria. Infatti il tempo che una sostanza trascorre nella colonna dipende dal valore di C_s rispetto a C_m : così, un'elevata concentrazione nella fase stazionaria, rispetto a quella nella fase mobile, indica una maggiore affinità per la prima.

In altre parole, l'eluente (fase mobile) incontrerà una certa difficoltà nel trascinare con sé alcune sostanze, mentre altre, relativamente più affini ad esso e meno verso la fase stazionaria, verranno più facilmente dislocate dalle posizioni che occupano e trasportate così verso la coda della colonna, separandosi sempre di più dalle sostanze maggiormente trattenute.

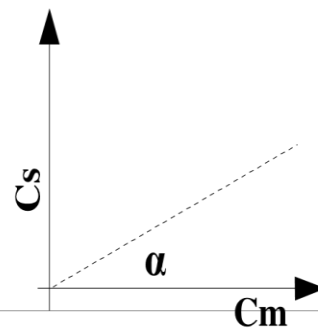
Coefficiente di distribuzione e isoterme di distribuzione

L'equazione

$$K = C_s / C_m$$

è l'equazione di una retta, la cui pendenza è data da

$$\text{tg } \alpha = K.$$



Nella figura 1 è riportata tale retta, detta **isoterma di distribuzione**, di due sostanze A e B per le quali $K_A < K_B$.

Ciò significa che la sostanza B è più affine per la fase fissa di quanto lo sia la sostanza A. Se queste due sostanze A e B percorrono insieme la colonna, accade che A uscirà per prima.

Quanto maggiore è la differenza di K tanto migliore sarà la separazione tra le sostanze.

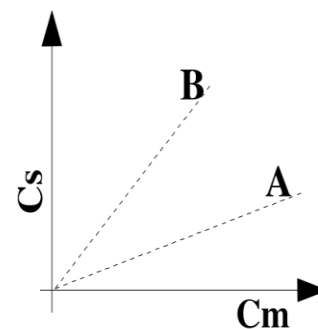


fig. 1

In pratica le isoterme non hanno l'andamento teorico visto, ma si presentano come in fig. 2.

Ad esempio ad un certo punto la fase fissa non trattiene la stessa quantità di sostanza rispetto alla fase mobile e si avvicina alla saturazione, cioè la capacità solvente della fase fissa può dirsi esaurita.

Per questa ragione le singole zone del cromatogramma non hanno contorno preciso e simmetrico.

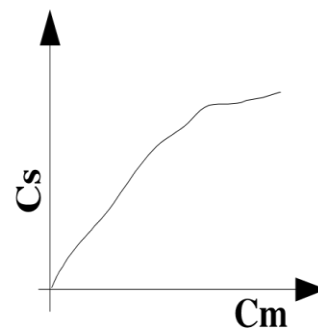


fig. 2

1.4 Le tecniche cromatografiche

La classificazione fondamentale dei metodi cromatografici si basa sul fatto che la fase mobile può essere un liquido (cromatografia liquida) o un gas (cromatografia gassosa o gas-cromatografia).

Mentre la cromatografia liquida può essere realizzata su colonna, su strato sottile e su carta, la gas-cromatografia è limitata all'uso della colonna.

Tenuto conto dei diversi meccanismi di separazione e delle diverse soluzioni sperimentali adottabili, si sono sviluppate numerose tecniche cromatografiche, che comprendono:

Cromatografia su strato sottile (TLC), dove la fase stazionaria può essere gel di silice, allumina, cellulosa in polvere, fatta aderire ad un apposito supporto (alluminio, carta plastificata, lastra di vetro) e la fase mobile è costituita da vari solventi organici.

Le tecniche di eluizione possono essere di tipo ascendente, discendente o orizzontale.

Cromatografia su carta (PC), dove la fase stazionaria è costituita dall'acqua inevitabilmente presente nella cellulosa come umidità (20%), anche se la carta può essere all'occorrenza trattata con liquidi diversi, e la fase mobile è scelta in funzione del tipo di fase stazionaria e delle proprietà chimiche dei composti da separare. Quasi sempre comunque è una miscela contenente acqua.

Cromatografia su colonna a bassa pressione (LPC). Il modo non è molto dissimile da quello descritto originariamente da Tswett. La fase mobile è un liquido organico a bassa viscosità mentre le fasi stazionarie, solide, liquide o gel, possono avere caratteristiche chimico-fisiche molto variabili. La tecnica prevede la deposizione in testa ad una colonna (impaccata con un'opportuna fase fissa) di una certa quantità di miscela da separare. Facendo scorrere l'eluente lungo questa colonna si ottiene una certa distribuzione dei componenti della miscela lungo la fase stazionaria (vedi figura nella pagina iniziale).

Cromatografia in fase liquida ad elevate prestazioni (HPLC), che consiste nella versione strumentale della cromatografia su colonna. L'eluente viene fatto fluire ad alta pressione e le sostanze in uscita vengono rilevate strumentalmente con opportuni dispositivi.

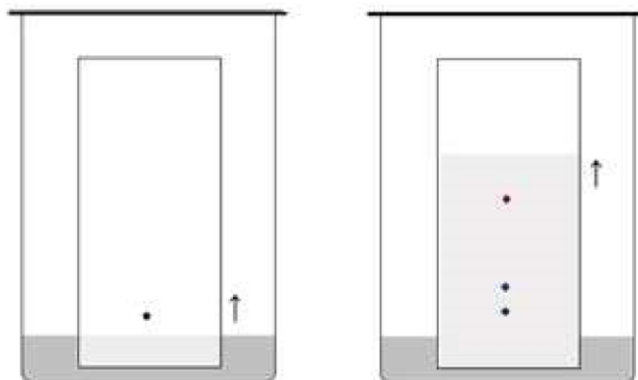
Gasromatografia in fase liquida ad elevate prestazioni (GC), in cui la fase mobile è un gas, e che verrà dettagliatamente studiata nel capitolo successivo.

IMPIEGHI DELLA CROMATOGRAFIA

Le applicazioni della cromatografia interessano un vasto campo della chimica, dall'inorganica all'organica, sia di sintesi che naturale.

In particolare la cromatografia è una tecnica indispensabile nella chimica di sintesi e delle sostanze organiche naturali, per isolare e purificare i componenti di miscele di varia natura, e in campo biologico per purificare polisaccaridi, proteine, acidi nucleici, virus e anche cellule.

CROMATOGRAFIA SU STRATO SOTTILE (TLC)



La cromatografia su strato sottile o TLC, è una tecnica cromatografica di semplice preparazione; questo la rende particolarmente adatta per l'esecuzione di valutazioni qualitative o semi-quantitative.

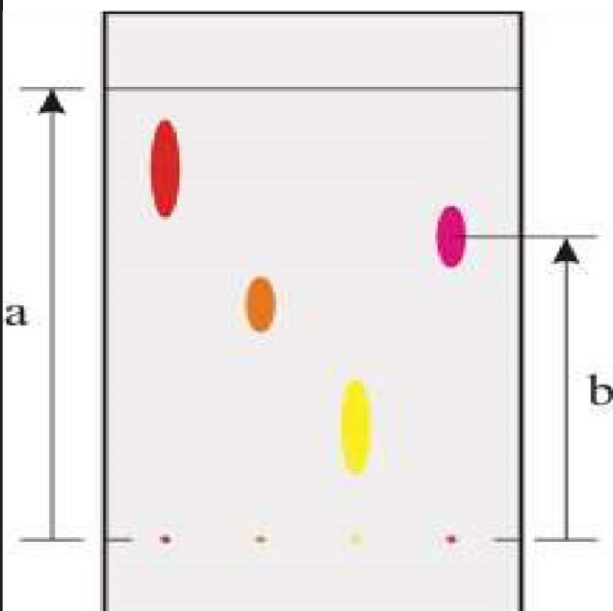
Come tutte le cromatografie, si basa sulla diversa separazione di diverse sostanze tra una [fase stazionaria](#) ed una [fase mobile](#), in funzione dell'affinità di ogni sostanza con esse.

SCELTA DELLA FASE MOBILE E DELLA FASE STAZIONARIA

1. Le due fasi devono necessariamente interferire tra loro il meno possibile;
2. In qualche misura i componenti della miscela da separare devono interagire con le due fasi;
3. Il campione deve essere solubile nell'eluente;
4. Con le comuni fasi stazionarie solide gli idrocarburi non sono affatto adsorbiti e sono i primi ad essere eluiti, l'affinità per tali tipi di fasi stazionarie decresce nel seguente ordine: acidi, alcoli, ammine, tioli, aldeidi, chetoni, esteri, eteri, alcheni, alcani;
5. Per la scelta dell'eluente si fa riferimento alla serie eluotropa;
6. L'attività dell'adsorbente è determinante per la cromatografia in fase diretta, mentre, per quella in fase inversa sono determinanti anche piccole differenze nella polarità del materiale scelto.
7. $R_f \leq 0,5$; $\Delta R_f \geq 0,1$; il ΔR_f tra due componenti della miscela deve essere il più alto possibile.

R_f : ds/de

TECNICA CROMATOGRAFICA

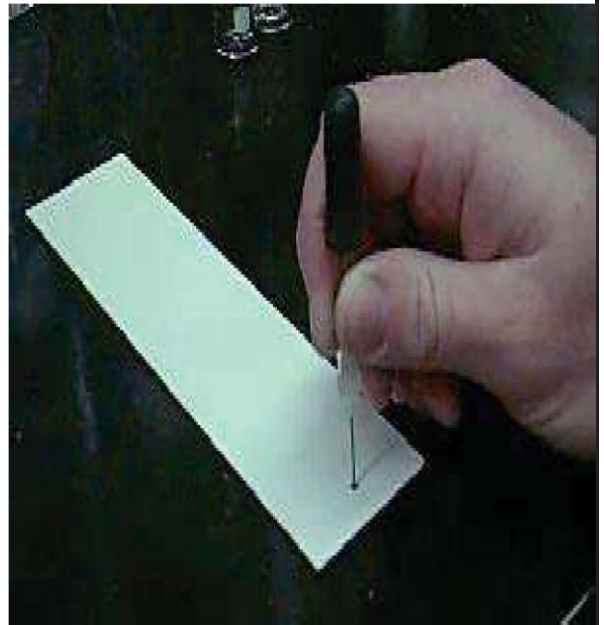


La traccia arancione è la sostanza più affine con l'eluente in quanto ha percorso un tragitto più lungo.

La traccia gialla rappresenta meno affine all'eluente (o più trattenuta dalla fase stazionaria), ha percorso una distanza minore.

SEMINA

La semina viene effettuata con il nostro campione da analizzare, tramite un apparecchio chiamato microsiringa o con un semplice capillare di vetro aperto; questo procedimento deve essere fatto accuratamente

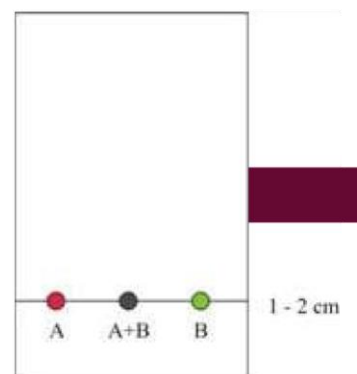
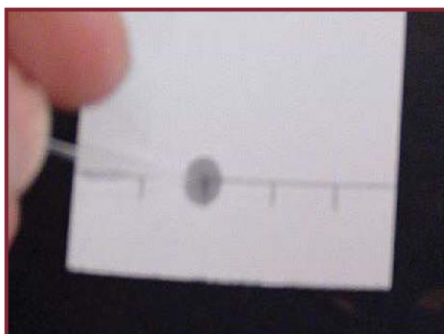


Come operiamo?

Deposizione del campione

Il campione deve essere deposto alla base della lastrina, con l'aiuto di un capillare come macchia (deposizione a goccia) o come striscia (deposizione lineare), nel modo più compatto possibile.

Il campione deve essere deposto senza intaccare lo strato di fase stazionaria. Se il campione è molto diluito, occorre depositare il campione più volte e perciò è utile asciugare la macchia con un asciugacapelli in modo da evitare un allargamento eccessivo.

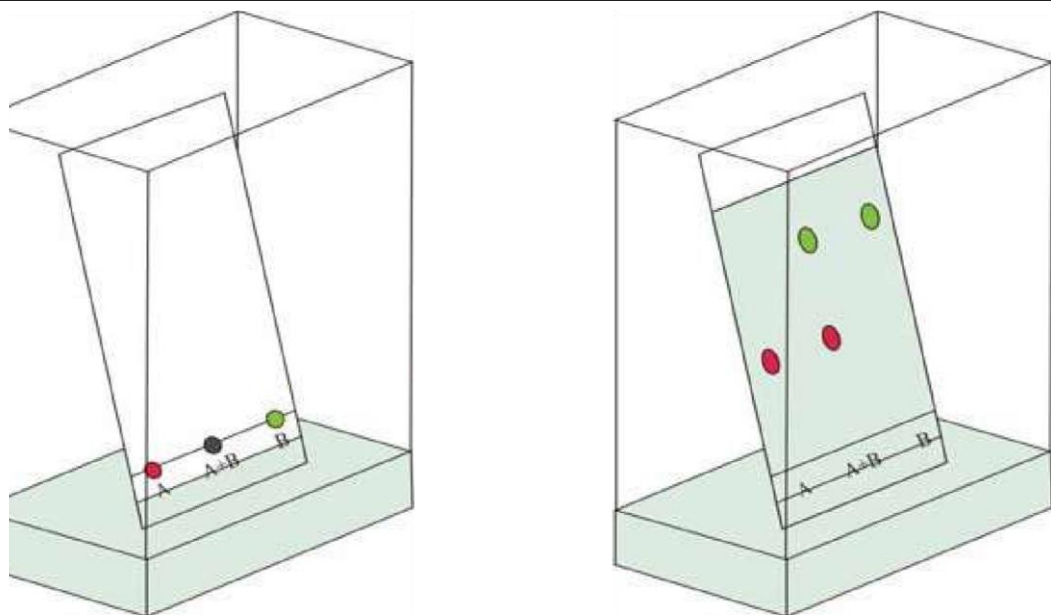


Camera cromatografica

Recipiente, generalmente, di vetro di forma e volume opportuno, dotato di un coperchio a tenuta;
L'eluente deve essere versato nel recipiente, in modo da raggiungere il livello di 0,5-1 cm; poi si chiude il coperchio e si lascia condizionare;

Eluizione

Lo sviluppo del cromatogramma è uno sviluppo ascendente



Sviluppo ascendente della lastrina
semplice impiegato, l'eluente migra verso l'

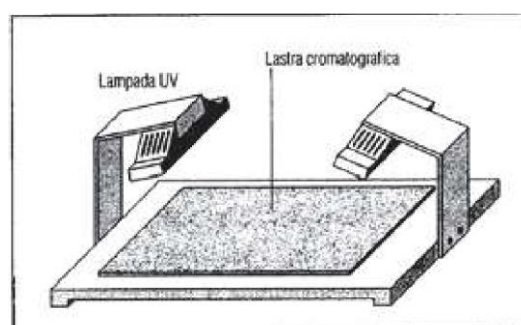
Lo ^s comun
ato di fase stazionaria per capillarità
uno str

è quello
'alto attrave

- Quando lo sviluppo è completato (solvente ad 1 cm dal bordo superiore) estrarre la lastra dalla camera cromatorafica;
- Segnare il fronte del solvente;
- Asciugare la lastrina all'aria o con l'aiuto di un phon, se le sostanze non sono termolabili si può porre il tutto in una stufa per qualche minuto a 100-105°C;
- Cerchiare con la matita le macchie visibili critto più avanti
- Calcolare i parametri come descritti

Visualizzazione dei risultati

Rivelazione con luce UV



Presenza di cromofori → lampada UV (254 e

366 nm) Se invece le sostanze da rivelare non possiedono cromofori, si può usare una lastra la cui fase stazionaria, prima o dopo l'eluizione, viene impregnata di una sostanza fluorescente ai raggi UV. Illuminando la lastra con le apposite lampade, si osservano delle macchie scure su sfondo fluorescente.

Un indicatore di fluorescenza molto usato è un silicato di zinco e magnesio attivato che a 254 nm da una fluorescenza verde.



