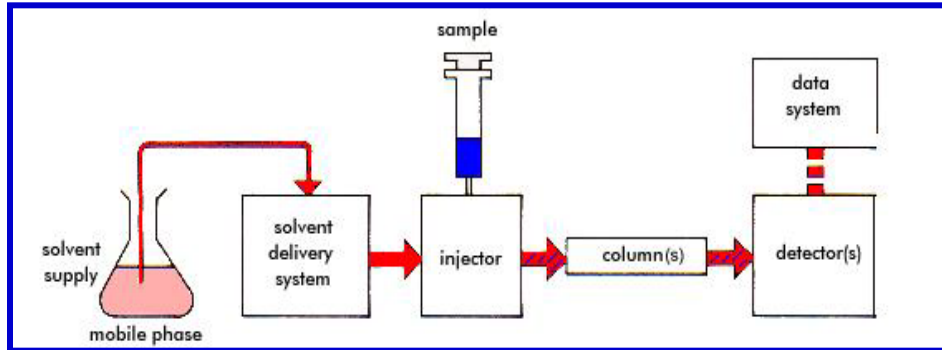
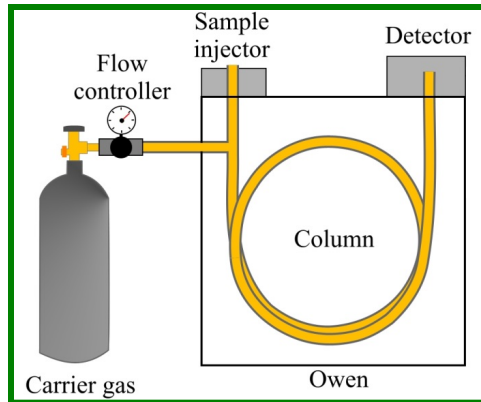
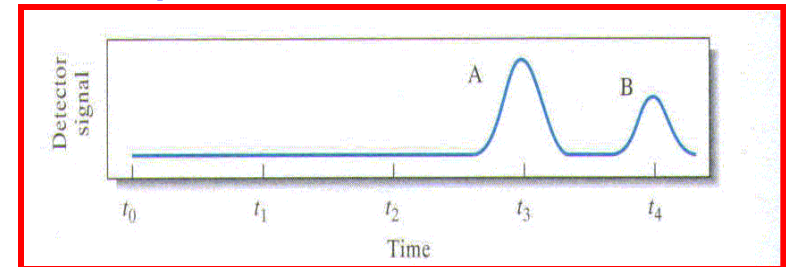


# Cromatografia

Il termine **cromatografia** racchiude una serie di metodi analitici impiegati per **separare e quantificare singolarmente i diversi componenti presenti in miscele di analiti anche molto complesse.**



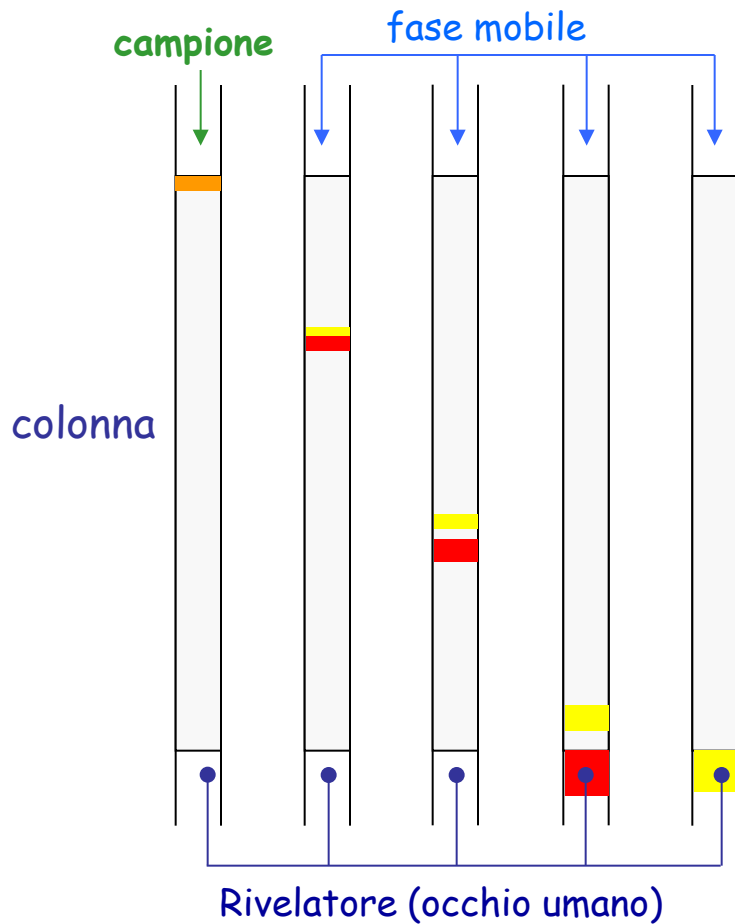
**cromatogramma**



La separazione nel tempo degli analiti dipende dalla **diversa entità della loro interazione con la fase stazionaria presente nella colonna.**

Il rivelatore è un dispositivo in grado di segnalare il passaggio di ciascuno di essi fornendo **un segnale proporzionale alla loro concentrazione o quantità.**

## Il primo esperimento cromatografico della storia



Nel Marzo 1903 il botanico russo Mikhail Tswett riuscì a separare vari pigmenti colorati di origine vegetale (clorofille, xantofille) facendo passare miscele di questi attraverso una **colonna di vetro riempita con carbonato di calcio**.

I pigmenti si separarono in singole bande colorate lungo la colonna.

Il termine **cromatografia** deriva appunto dalla combinazione delle parole greche

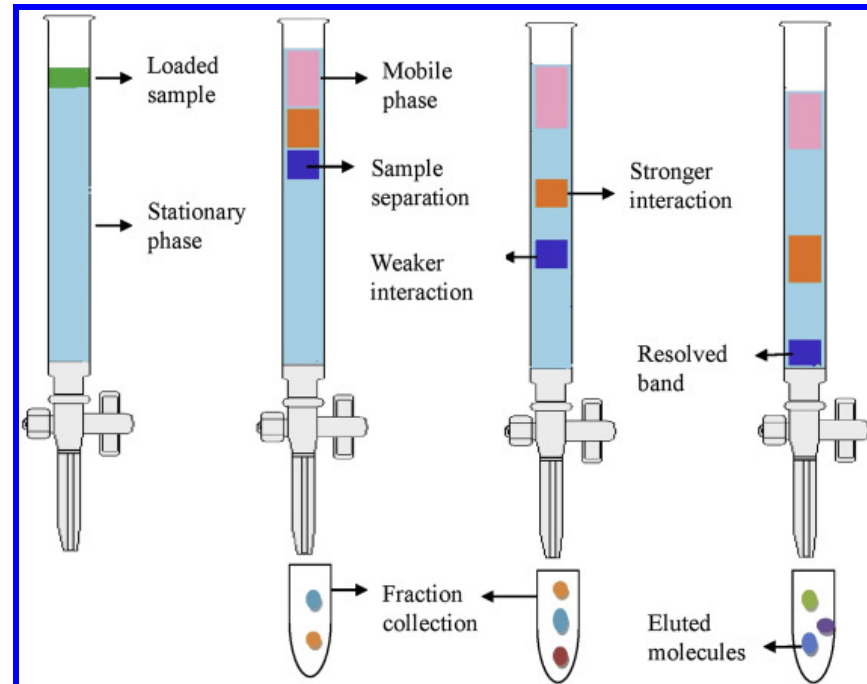
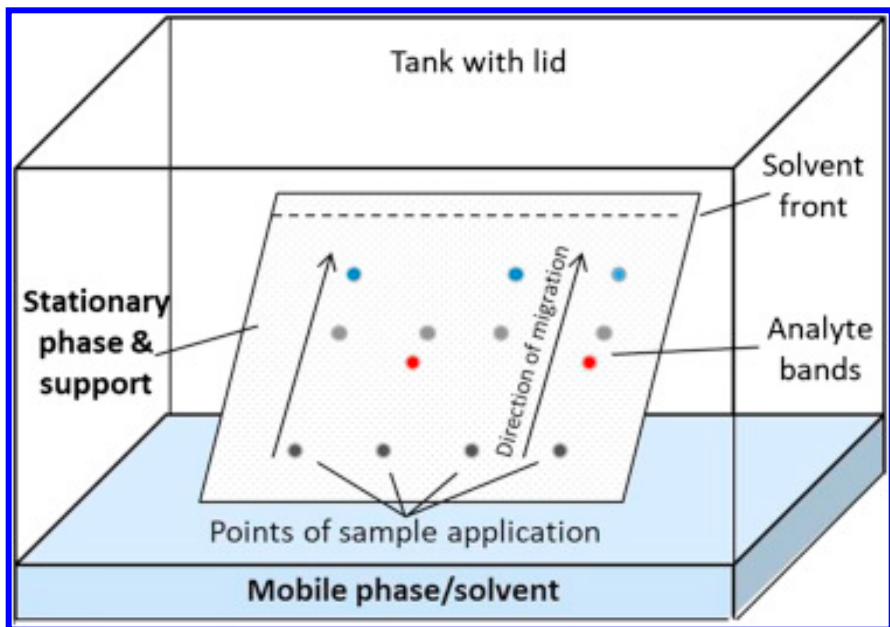
**chroma (colore) e graphein (scrivere)**

# Classificazioni dei metodi cromatografici

Modalità di contatto  
fra la fase mobile e la  
fase stazionaria

Cromatografia  
planare

Cromatografia  
su colonna



Stato di aggregazione della fase mobile

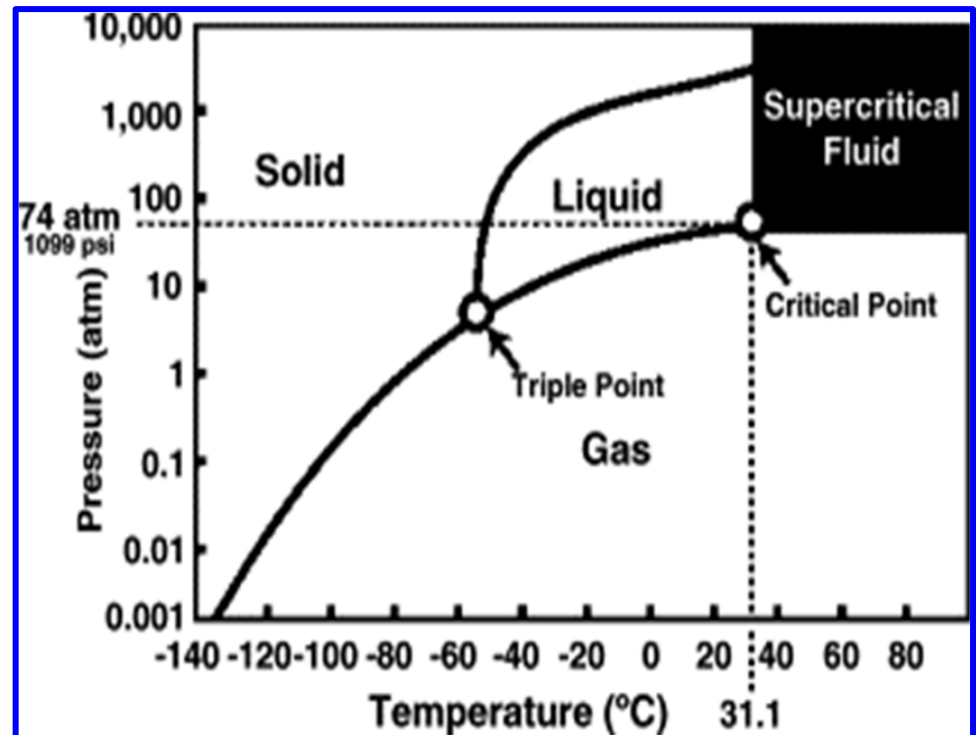
Cromatografia liquida (LC)

Gas-cromatografia (GC)

Cromatografia in fluido supercritico\* (SFC)

\*Una sostanza diventa un **fluido supercritico** quando viene sottoposta a pressioni e temperature superiori a quelle corrispondenti al suo **punto critico**. In tali condizioni essa assume proprietà intermedie fra quelle del liquido e quelle del gas corrispondente.

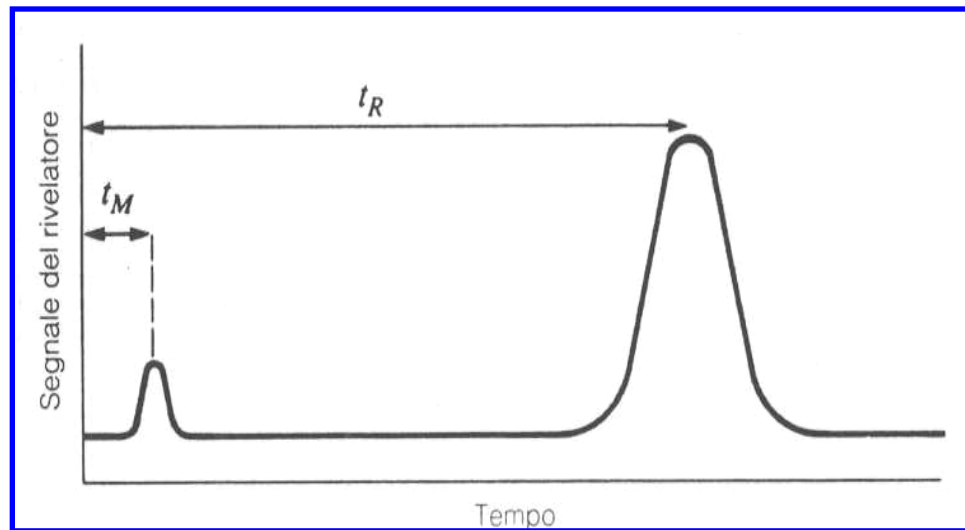
La  $CO_2$ , a cui si riferisce il diagramma a destra, diventa supercritica in condizioni relativamente semplici da raggiungere.



Classificazione	Metodi specifici	Fasi stazionarie	Tipo di equilibrio
Cromatografia in fase liquida (LC)	Liquido-liquido o di ripartizione	Liquido adsorbito su un solido	Ripartizione fra liquidi immiscibili
	Liquido-fase legata	Specie organica legata ad una superficie solida	Ripartizione fra liquido e superficie legata
	Liquido-solido o di adsorbimento	Solido	Adsorbimento
	Scambio ionico	Resina a scambio ionico	Scambio ionico
	Esclusione dimensionale	Liquido nelle porosità di un solido polimerico	Ripartizione/effetto di esclusione
Gas-cromatografia (GC)	Gas-liquido	Liquido adsorbito su un solido	Ripartizione tra gas e liquido
	Gas-fase legata	Specie organica legata	Ripartizione tra gas e fase legata
	Gas-solido	Solido	Adsorbimento

## Parametri fondamentali associati ai metodi cromatografici

**Tempo di ritenzione ( $t_R$ ):** è il tempo che intercorre fra l'iniezione del campione e la rivelazione di un analita eluente dalla colonna

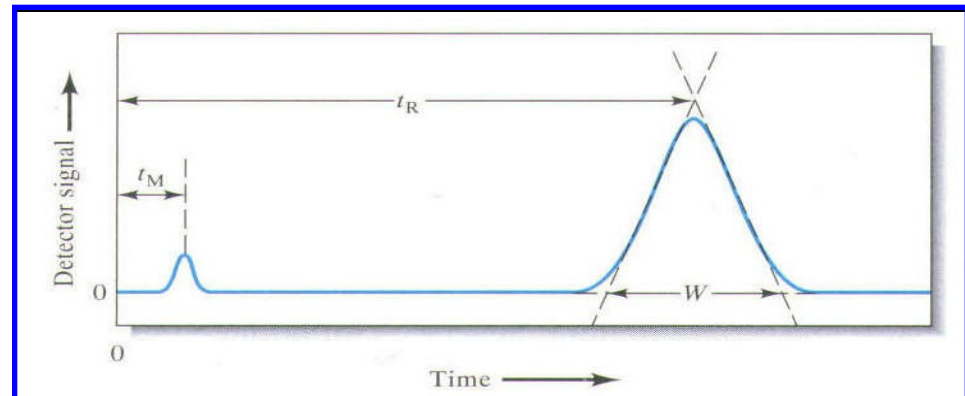
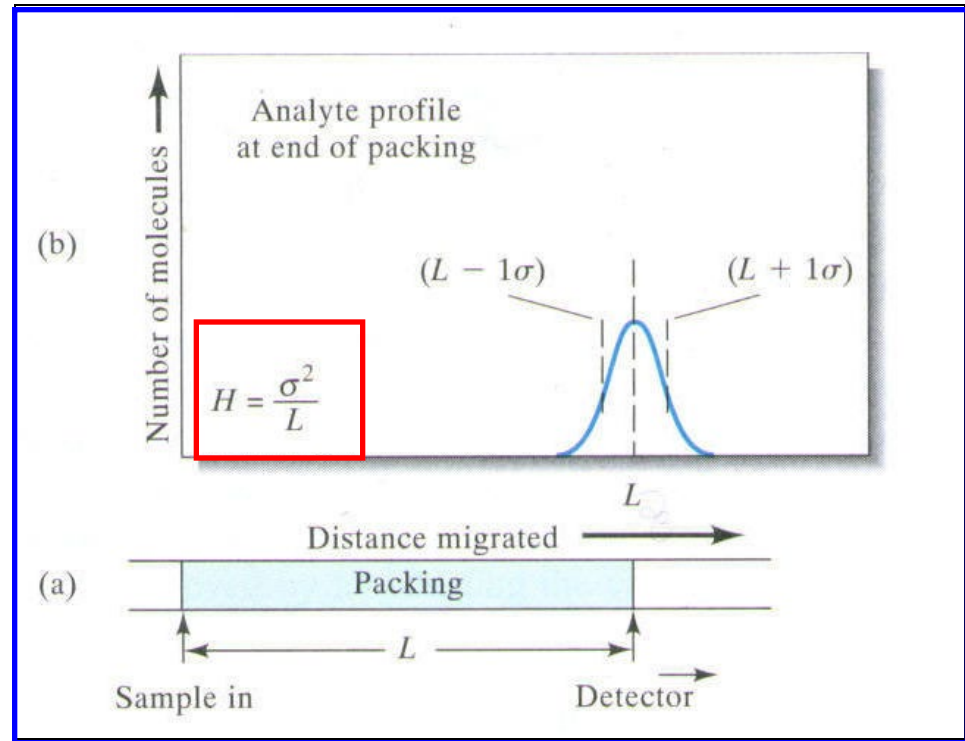


**Tempo morto ( $t_M$ ):** è il tempo che un analita non ritenuto affatto sulla fase stazionaria (che quindi viaggia alla stessa velocità della fase mobile) impiega per giungere al rivelatore

## Altezza equivalente di "piatto teorico" (HETP)

un "piatto teorico" è una porzione di colonna cromatografica in cui si assume che un analita sia mediamente in equilibrio fra la fase mobile e la fase stazionaria. La sua altezza  $H$  è legata alla deviazione standard ( $\sigma$ ) di un picco cromatografico e alla lunghezza  $L$  di colonna:

In alternativa si può esprimere l'altezza di piatto teorico in funzione della larghezza alla base,  $W$ , del picco cromatografico:



Poiché  $W = 4\tau$ , dove  $\tau$  è il tempo che la fase mobile impiega per percorrere la distanza  $\sigma$ , ossia  $\tau = \sigma / (L/t_R) = \sigma t_R/L$ , si ricava che:

$$H = \frac{LW^2}{16t_R^2}$$

**Numero di piatti teorici (N):** è dato dal rapporto fra la lunghezza della colonna e l'altezza di piatto teorico:

$$N = L/H = 16 (t_R/W)^2$$

In alternativa si può misurare N a partire dalla larghezza a metà altezza del picco cromatografico ( $W_{1/2}$ ):

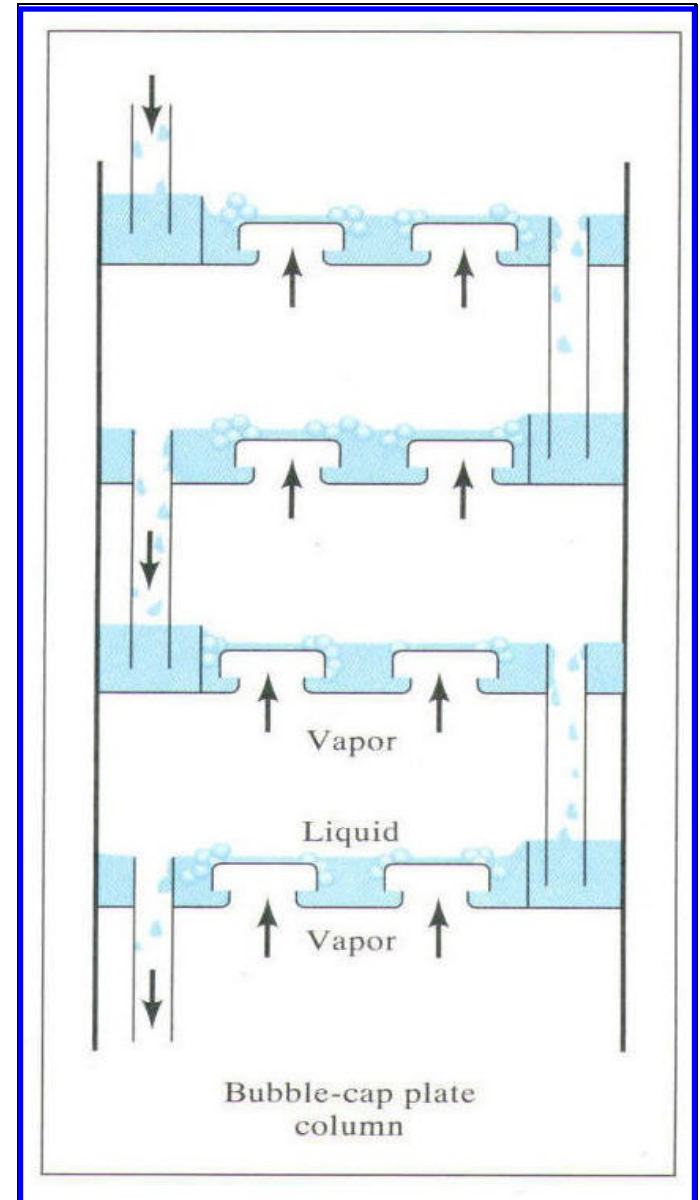
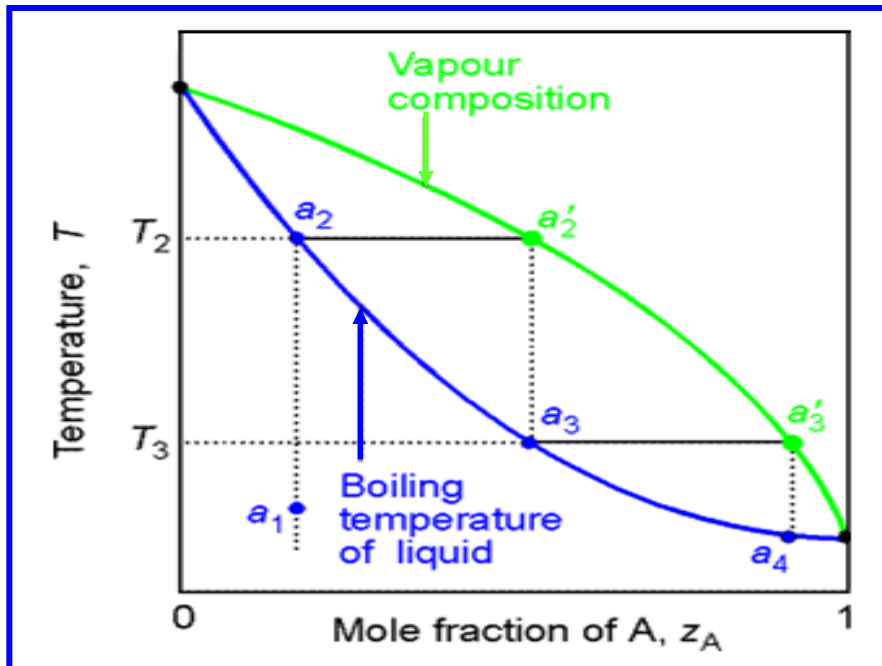
$$N = 5.54 (t_R/W_{1/2})^2$$



## Il concetto di altezza di piatto teorico: visualizzazione

Il concetto di piatto teorico in cromatografia deriva dal funzionamento dei piatti in cui sono suddivise le colonne di distillazione.

La temperatura diminuisce con l'altezza della colonna, portando ad arricchire il vapore dei componenti più volatili:



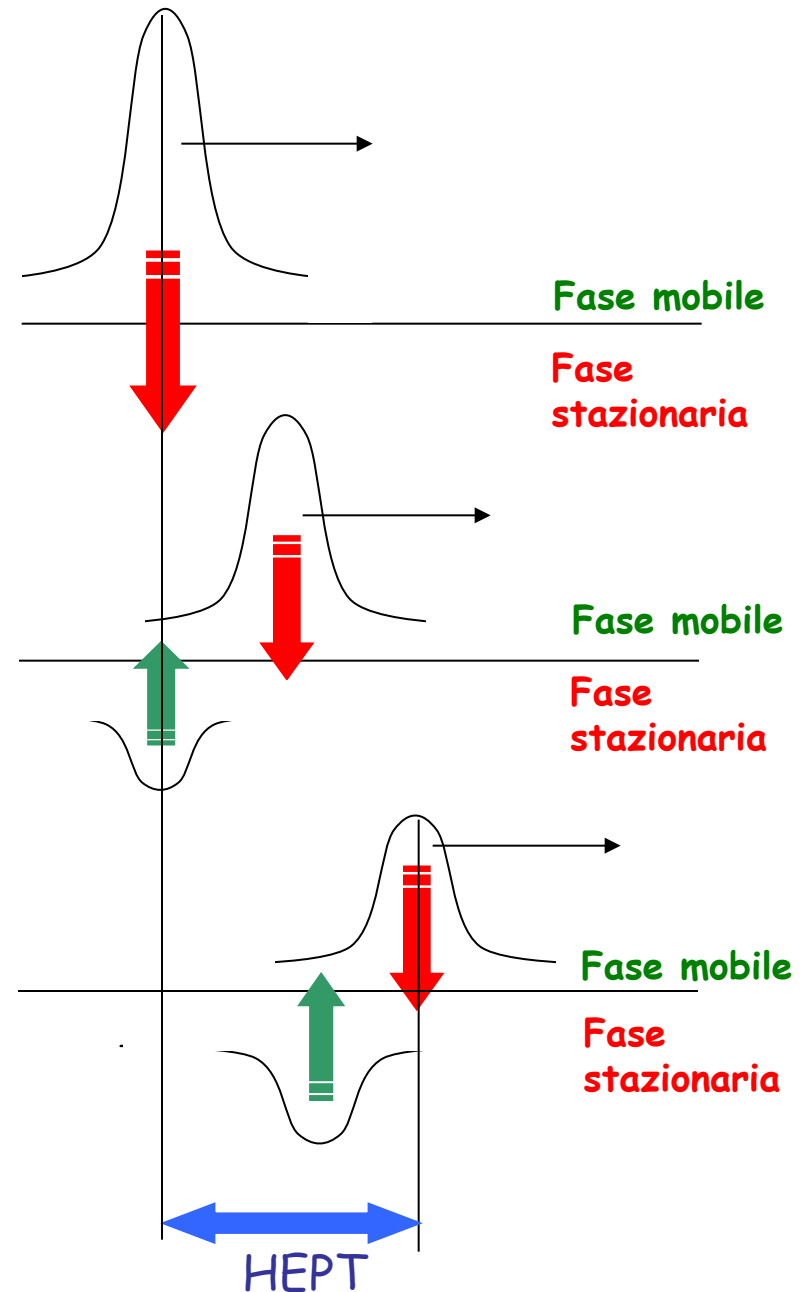
Altezza di piatto teorico per una  
colonna cromatografica:  
interpretazione fenomenologica

Il trasferimento dell'analita fra una fase e l'altra avviene continuamente nel corso della corsa cromatografica

Si può visualizzare il significato dell'altezza di piatto teorico rappresentando tre "istantanee" successive delle distribuzioni dell'analita nelle due fasi.

Vi sarà un momento nel quale le concentrazioni dell'analita nelle due fasi saranno quelle prevedibili su base termodinamica.

Una delle definizioni della HEPT si basa sullo schema mostrato a lato.



## Teoria dell'altezza di piatto teorico: Equazione di Van Deemter

L'Equazione sviluppata da **Van Deemter nel 1956**, e successivamente modificata, esprime in forma matematica l'esistenza di tre contributi all'allargamento del picco cromatografico (e quindi all'aumento di  $H$ ):

- 1) Diffusione longitudinale
- 2) Trasferimento di massa da e verso la fase stazionaria
- 3) Trasferimento di massa nella fase mobile

Eq. di Van Deemter

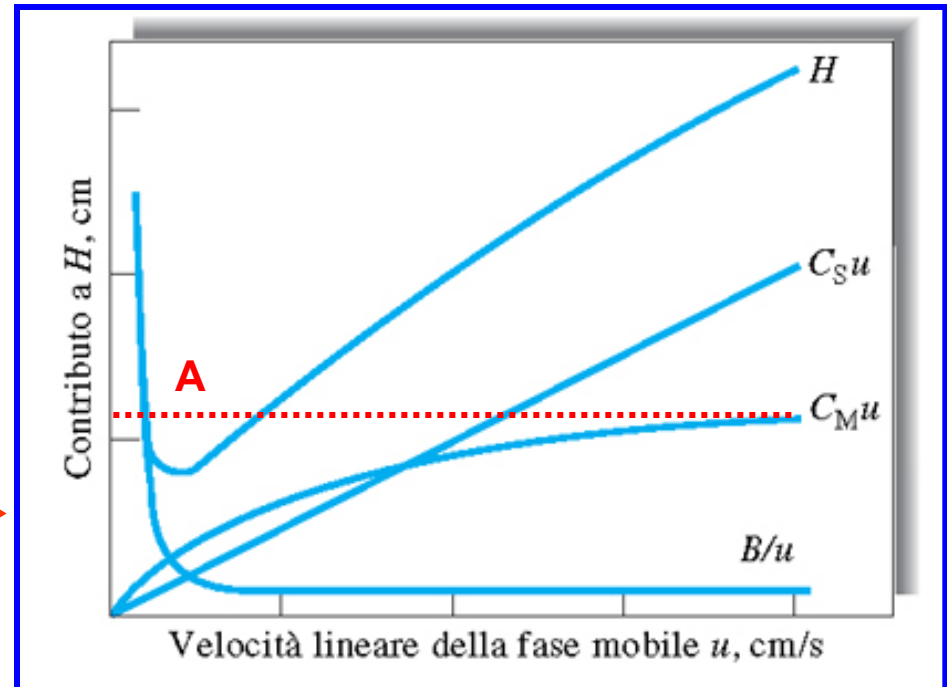
$$H = B/u + C_S u + A$$

1            2            3

Eq. di Van Deemter modificata (Golay)

$$H = B/u + C_S u + C_M u$$

1            2            3

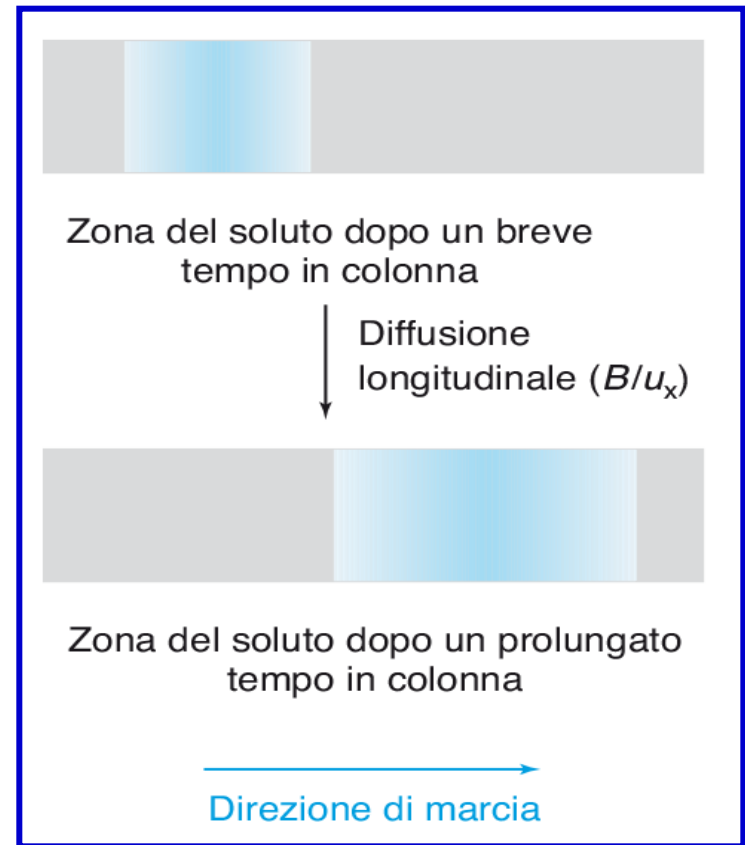


## 1) Diffusione longitudinale

$$\frac{B}{u} = \frac{2k_D D_M}{u}$$

$k_D$  = fattore di ostruzione (indica la resistenza alla diffusione dovuta alla presenza di un impaccamento;  $k_D$  aumenta al diminuire dell'ostruzione in colonna)

$D_M$  = coefficiente di diffusione dell'analita nella fase mobile



Il termine  $B/u$  esprime l'allargamento del picco cromatografico conseguente alla diffusione dell'analita all'interno della fase mobile.

Maggiore è la velocità  $u$  della fase mobile minore sarà il tempo a disposizione dell'analita per diffondere al suo interno, dunque minore sarà anche l'allargamento del picco.

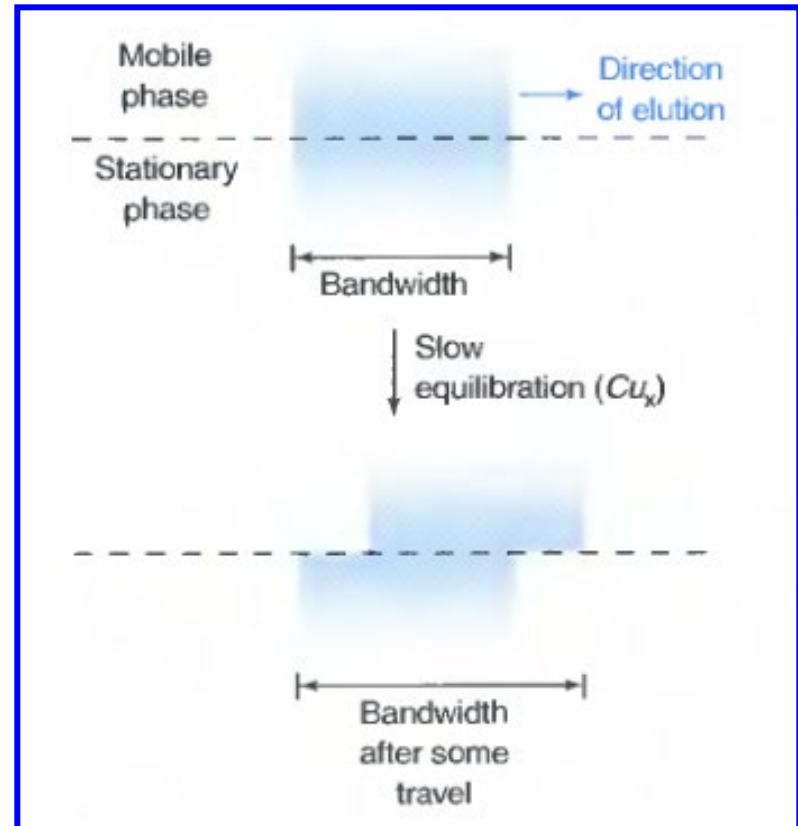
2) Trasferimento di massa da e verso la fase stazionaria

$$C_s u = \frac{q k' d_f^2}{(1+k')^2 D_s} u$$

liquida

$$C_s u = \frac{2 t_d k'}{(1+k')^2} u$$

solida



$q$  = costante,  $k'$  = fattore di capacità,  $d_f$  = spessore del rivestimento liquido depositato sulle particelle dell'impaccamento,  $D_s$  = coefficiente di diffusione dell'analita nella fase stazionaria liquida

$t_d$  = tempo medio di desorbimento dell'analita dalla superficie delle particelle di fase stazionaria

### 3) Trasferimento di massa nella fase mobile

$$C_M u = \frac{f(d_P^2, d_C^2, u)}{D_M} u$$

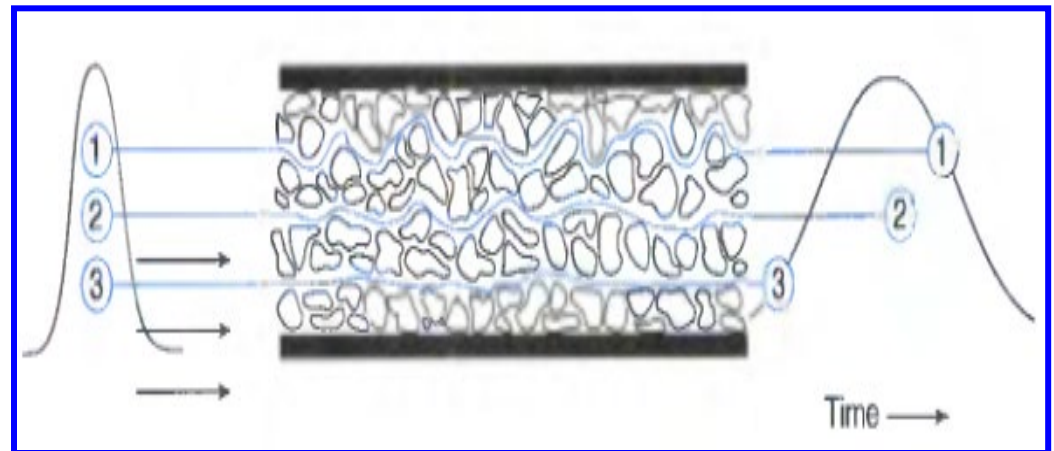
$f$  = funzione di

$d_p$  = diametro delle particelle di impaccamento

$d_c$  = diametro della colonna

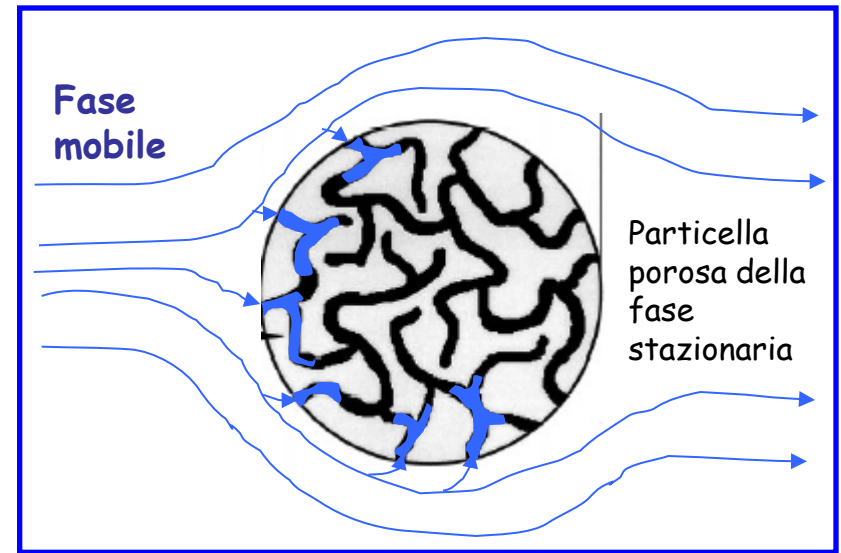
Questo contributo all'aumento di  $H$  ha origini molteplici. Le due principali si riferiscono alle differenze di cammino sperimentate da molecola di analita diverse nella fase mobile:

1) **La molteplicità dei cammini** disponibili ad una molecola di analita **all'interno della colonna cromatografica impaccata** con le particelle di fase stazionaria.

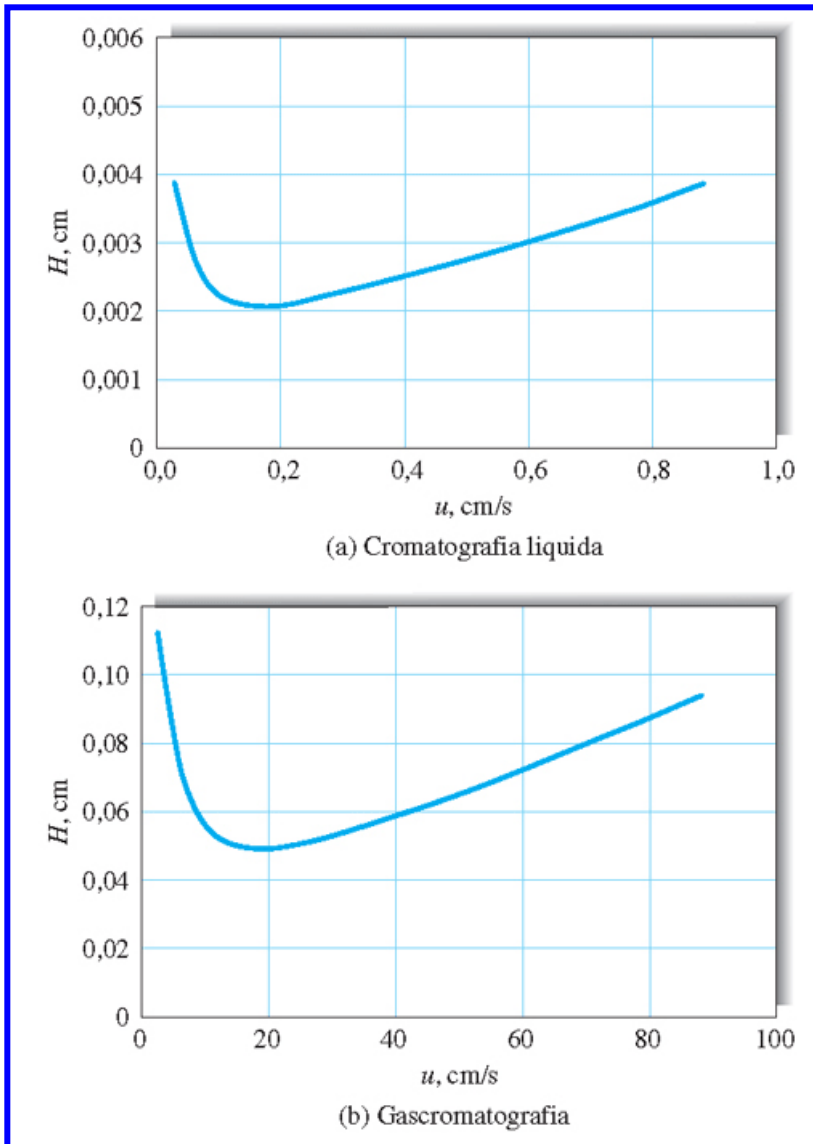


Il ristagno di fase mobile all'interno dei **canali interni** delle particelle di impaccamento induce la penetrazione di molecole di analita all'interno degli stessi, seguita dall'interazione con la fase stazionaria depositata sulle pareti dei canali e, infine, dalla fuoriuscita dai canali.

**Dimensioni molto diversificate dei canali interni possono indurre significative differenze di cammino.**



## Confronto fra gli andamenti di $H$ per la cromatografia liquida e la cromatografia gas-liquido



In cromatografia gas-liquido si nota un più netto incremento del valore di  $H$  alle basse velocità, dovuto al peso maggiore del termine  $B/u$  (il coefficiente di diffusione degli analiti in fase gassosa è infatti molto più elevato di quello in fase liquida).

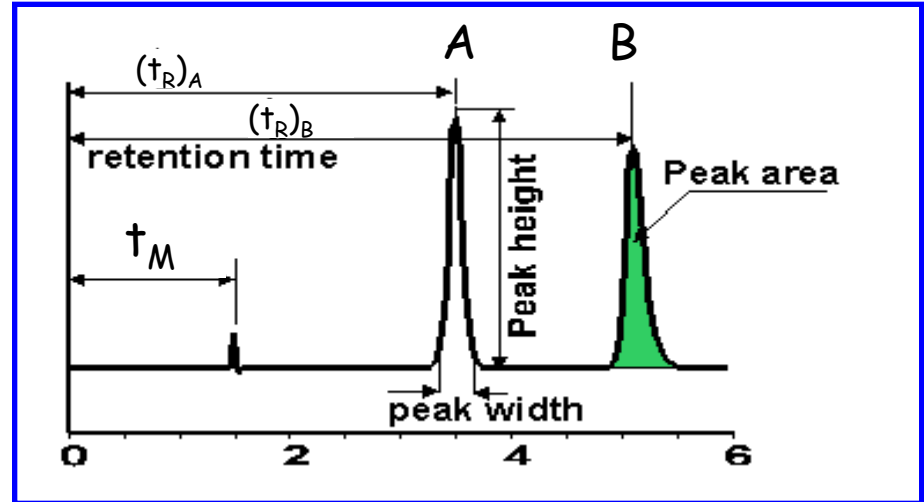
In assoluto i valori di  $H$  sono superiori in GC ma il numero di piatti teorici che raggiunge una colonna GC è superiore, in virtù della sua maggiore lunghezza.

In ogni caso il valore ottimale di velocità a cui operare corrisponde al minimo della curva ( $H$  minimo  $\rightarrow$  minore slargamento dei picchi).



**Fattore di selettività  $\alpha$ :** è una misura della capacità del metodo cromatografico di separare due specie A e B:

$$\alpha = \frac{(t_R)_B - t_M}{(t_R)_A - t_M} = K_B/K_A$$



dove  $K_B$  e  $K_A$  sono le costanti relative all'equilibrio fra la fase mobile e quella stazionaria delle specie B e A rispettivamente.

**Fattore di capacità  $k'$ :** descrive, in modo normalizzato, il tempo trascorso dall'analita in colonna:

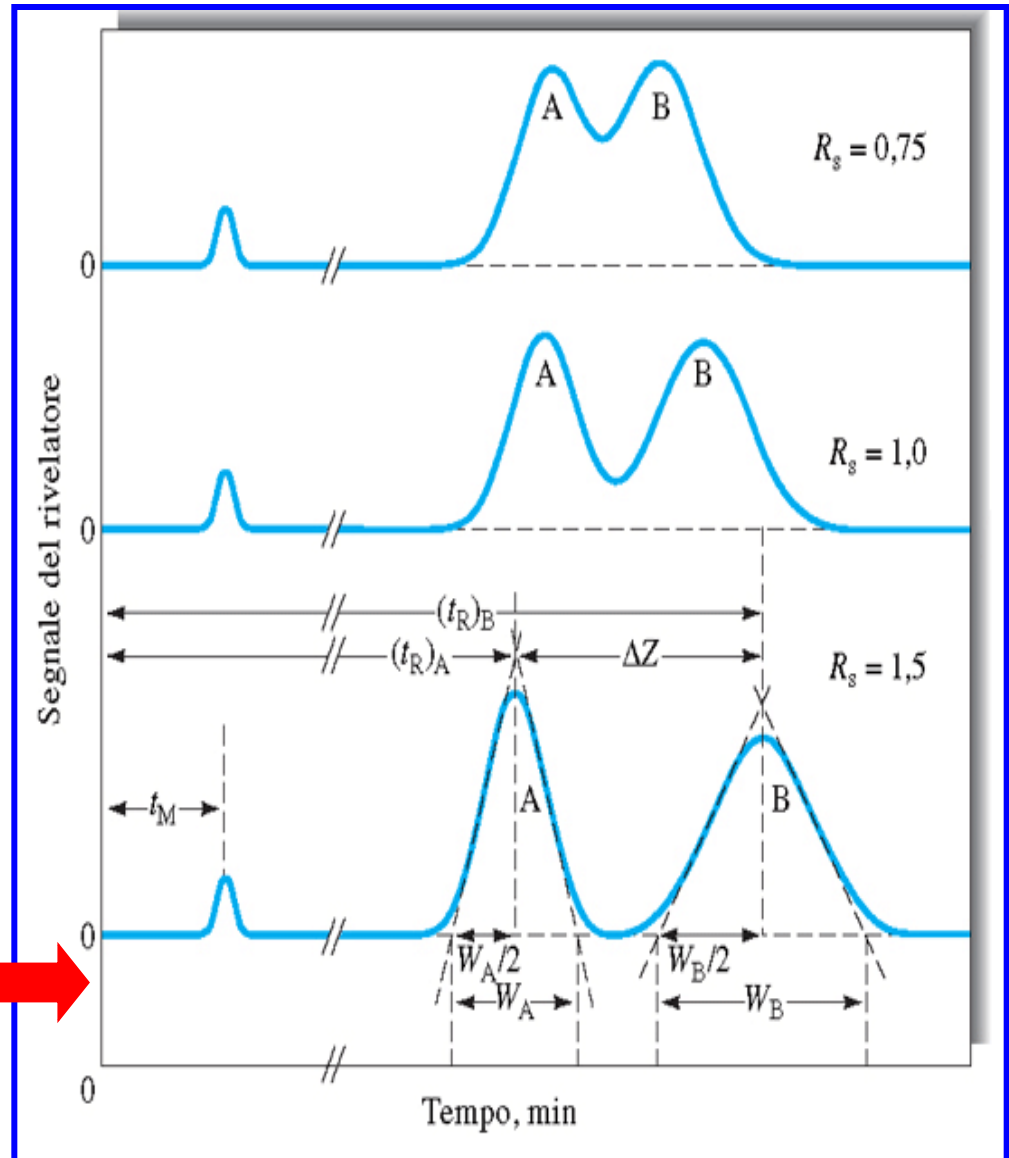
$$k' = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

# Risoluzione di una separazione cromatografica ( $R_s$ )

La risoluzione dà una misura quantitativa dell'efficienza di una colonna cromatografica nella separazione di due analiti:

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

Una separazione cromatografica deve tendere al massimo valore possibile di  $R_s$  (e che sia almeno pari ad 1.5 per qualunque coppia di picchi adiacenti).



## Espressione alternativa della risoluzione

Se si considerano due picchi cromatografici prossimi A e B, per i quali si può quindi ritenere uguale la larghezza alla base ( $W_A = W_B = W$ ), si ottiene la seguente **espressione alternativa per la risoluzione**:

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \left( \frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left( \frac{k'_B}{1 + k'_B} \right)$$

N = numero di piatti teorici,

$\alpha$  = fattore di selettività,

$k'_B$  = fattore di capacità per l'analita B

Per **aumentare la risoluzione** occorre dunque:

- ✓ **rendere massimo N (ossia minimizzare H)** operando sulle caratteristiche della colonna
- ✓ **aumentare  $\alpha$  e  $k'$** , variando le costanti di equilibrio per i due analiti (ossia operando sulla natura delle fasi stazionaria e mobile e sulla temperatura).