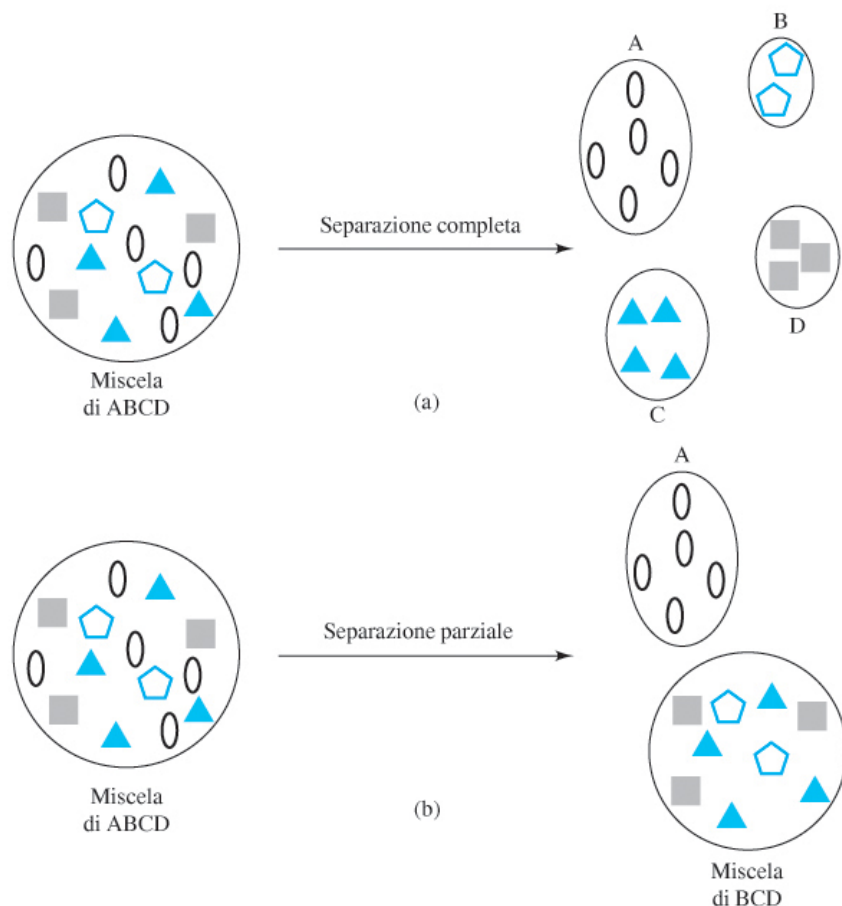


SEPARAZIONI ANALITICHE

Processi chimici e fisici di separazione

- precipitazione
- distillazione
- estrazione
- scambio ionico



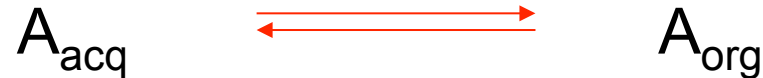
Esempio di una separazione totale (a) o parziale (b) di una miscela di diversi componenti



Skoog, West
Fondamenti di chimica analitica
EdiSES

SEPARAZIONI ANALITICHE: ESTRAZIONE CON SOLVENTE

Trasferimento selettivo di materia tra due fasi liquide immiscibili tra loro.



$$\frac{[A]_{\text{org}}}{[A]_{\text{aq}}} = K$$

$$\frac{C_{A_{\text{org}}}}{C_{A_{\text{aq}}}} = D$$

K = *coefficiente (“costante”) di ripartizione*

D = *coefficiente (“costante”) di distribuzione*

In assenza di reazioni e di interazioni soluto/solvente $K = D$

SEPARAZIONI ANALITICHE: ESTRAZIONE CON SOLVENTE

Efficienza di estrazione: dipende dai valori di K e D e dal volume relativo delle due fasi liquide.

Selettività di estrazione: è definita da un fattore di separazione β .

Nel caso di due soluti A e B $\beta = D_A/D_B$, se $D_A > D_B$.

Per poter essere estratto da una soluzione acquosa in un solvente meno polare dell'acqua, un soluto deve essere privo di carica o avere la possibilità di formare un aggregato non carico.

- | | | |
|--------------------------------|--|------------------------------|
| ➡ Molecole covalenti |  | Effetto del pH |
| ➡ Metallo/chelati non carichi |  | Effetto della complessazione |
| ➡ Formazione di coppie ioniche | | |

SEPARAZIONI ANALITICHE: ESTRAZIONE CON SOLVENTE

Effetto del pH



$$K_A = \frac{[H_3O^+] \times [A^-]}{[HA]}$$

$$\frac{[HA]_{org}}{[HA]_{aq}} = K$$

$$\frac{C_{HA_{org}}}{C_{HA_{aq}}} = D$$

$$C_{HA_{aq}} = [HA] + [A^-]$$

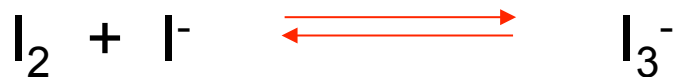
$$[A^-] = \frac{K_A \times [HA]}{[H_3O^+]}$$

$$C_{HA_{aq}} = [HA] \left(1 + \frac{K_A}{[H_3O^+]} \right)$$

$$D = \frac{[HA]_{org}}{[HA]_{aq} \left(1 + \frac{K_A}{[H_3O^+]} \right)}$$

$$D = K \times \frac{[H_3O^+]}{[H_3O^+] + K_A} = \alpha_0$$

Effetto della complessazione



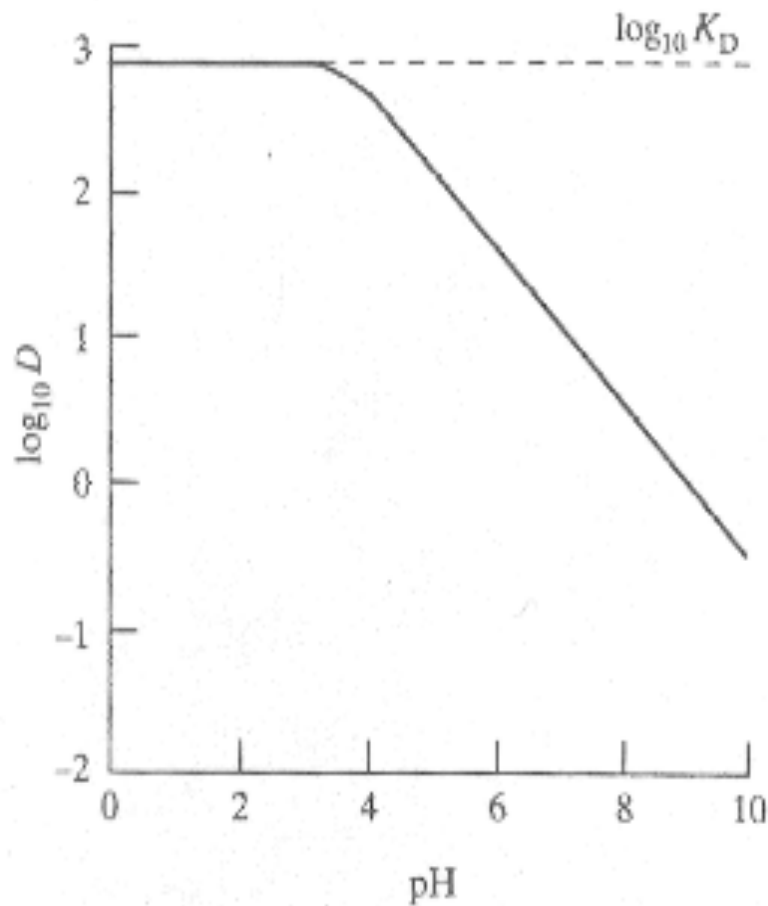
$$K_s = \frac{[\text{I}_3^-]}{[\text{I}_2] \times [\text{I}^-]}$$

$$C_{\text{I}_{2\text{aq}}} = [\text{I}_2] + [\text{I}_3^-]$$

$$D = \frac{C_{\text{I}_{2\text{org}}}}{C_{\text{I}_{2\text{aq}}}} = \frac{[\text{I}_2]_{\text{org}}}{[\text{I}_2] + [\text{I}_3^-]}$$

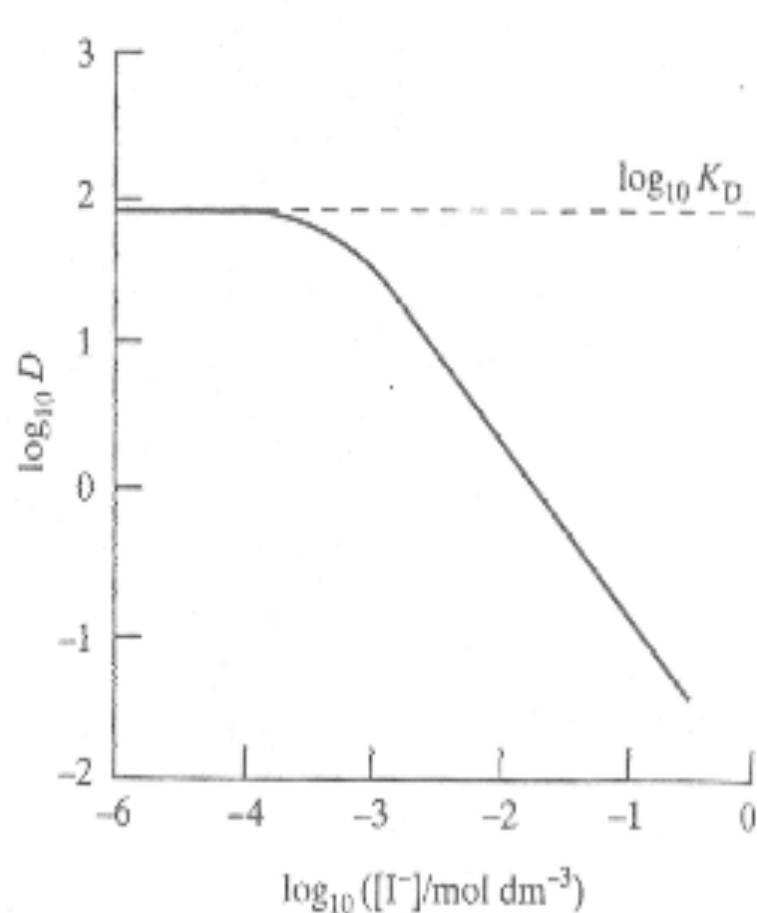
$$D = \frac{[\text{I}_2]_{\text{org}}}{[\text{I}_2] + K_s [\text{I}_2] [\text{I}^-]} = \frac{[\text{I}_2]_{\text{org}}}{[\text{I}_2] (1 + K_s [\text{I}^-])} = \frac{K}{1 + K_s [\text{I}^-]}$$

Effetto del pH



$$D = K \times \frac{[H_3O^+]}{[H_3O^+] + K_A}$$

Effetto della complessazione



$$D = \frac{K}{1 + K_s [I^-]}$$

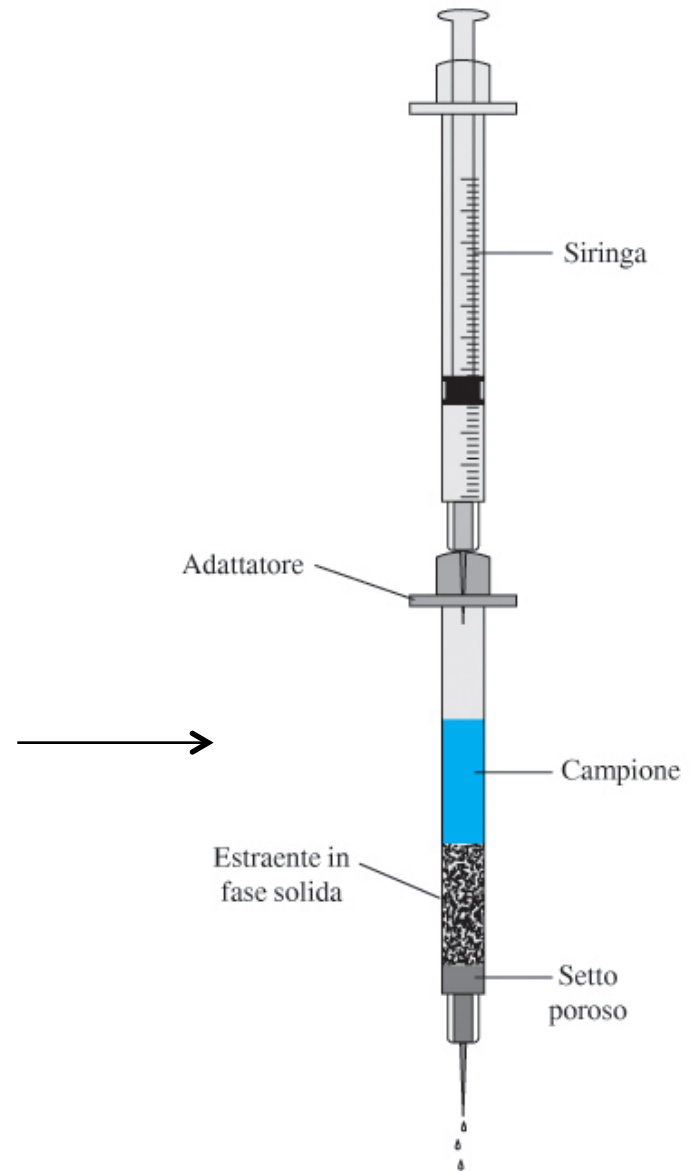
SEPARAZIONI ANALITICHE: ESTRAZIONE IN FASE SOLIDA

Si utilizzano membrane, o piccole colonne-siringa usa e getta oppure cartucce.

In questo caso si usa una piccola cartuccia.

Il campione (in fase liquida) è posto nella cartuccia che contiene, nell'area sottostante, un "agente estraente", e poi viene esercitata una pressione mediante uno stantuffo di una siringa.

In alternativa si può usare il vuoto per forzare il passaggio del campione attraverso l'agente estraente.



SEPARAZIONI ANALITICHE: SCAMBIO IONICO

Il meccanismo dello scambio ionico si utilizza per allontanare ioni inorganici da una soluzione acquosa e/o per separare gli ioni stessi ai fini della loro quantificazione.

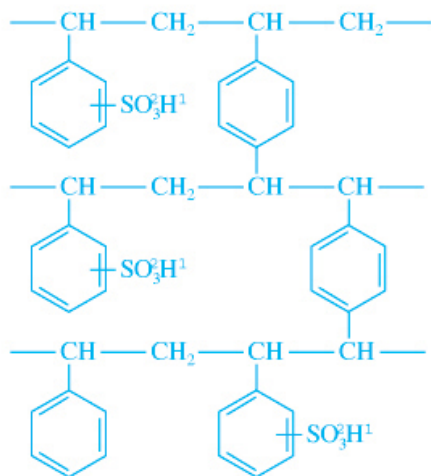
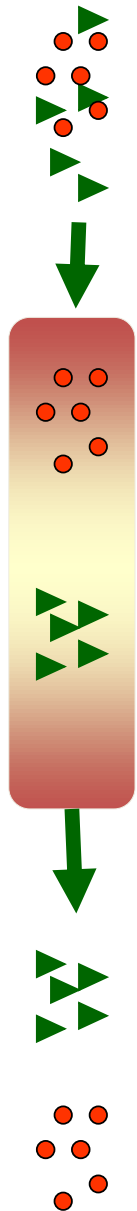


Figura 30-5 Struttura di una resina a scambio ionico a base di polistirene reticolato. Si usano resine analoghe nelle quali il gruppo $-\text{SO}_3\text{H}^+$ è sostituito dai gruppi $-\text{COO}^-\text{H}^+$, $-\text{NH}_3^+\text{OH}^-$ e $-\text{N}(\text{CH}_3)_3^+\text{OH}^-$.

INTRODUZIONE ALLA CROMATOGRAFIA



Insieme di tecniche che hanno lo scopo di separare una miscela nei suoi componenti, per permetterne il riconoscimento qualitativo e quantitativo.

Sono basate sulla distribuzione dei vari componenti fra due fasi, una chiamata **fase stazionaria** e l'altra chiamata **fase mobile** (o *eluente*), che fluisce in continuo attraverso la fase fissa.

E' stata usata per la prima volta nel 1906 dal botanico Tswett, per separare i diversi pigmenti presenti nelle foglie. La chiamò *cromatografia* → «scrittura del colore»



INTRODUZIONE ALLA CROMATOGRAFIA

Sequenza di tre fasi:

1. Eluizione della miscela con la fase mobile attraverso la fase stazionaria;
2. Separazione dei componenti in seguito all'eluizione;
3. Rivelazione dei composti separati.

La separazione avviene perché le molecole da separare hanno un diverso ***coefficiente di distribuzione o ripartizione***:

$$Kd = \frac{C_S}{C_M}$$

C_S = concentrazione nella fase stazionaria

C_M = concentrazione nella fase mobile

$Kd = 1 \rightarrow$ sostanza ugualmente ripartita nelle 2 fasi

$Kd < 1 \rightarrow$ sostanza maggiormente ripartita nella fase mobile

$Kd > 1 \rightarrow$ sostanza maggiormente ripartita nella fase stazionaria

CROMATOGRAFIA

La cromatografia sfrutta la diversa affinità di ogni molecola o ione nel distribuirsi tra due fasi diverse; una delle due fasi è immobilizzata (**fase stazionaria**) e l'altra viene fatta scorrere continuamente sulla prima (**fase mobile**).

Indipendentemente dal meccanismo della separazione ciascuna specie si trova coinvolta in un processo dinamico nel quale si trasferisce dalla fase mobile alla fase stazionaria e viceversa.



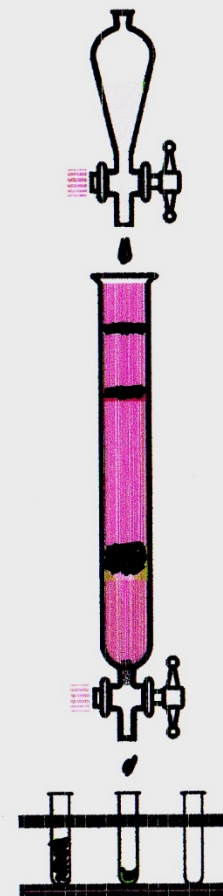
Costante di distribuzione
o di ripartizione

$$K = \frac{C_S}{C_M}$$

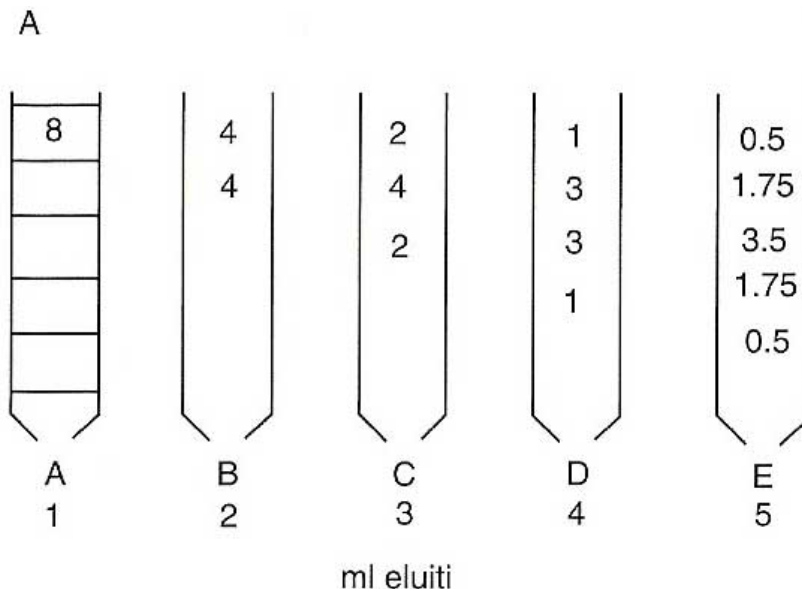
CROMATOGRAFIA SU COLONNA

Cromatografia liquida su colonna

- ❖ Deposizione del campione seguita da eluente.
- ❖ Flusso ottenuto per gravità.
- ❖ Si raccolgono frazioni.
- ❖ Le frazioni vengono analizzate da tecniche non in linea



CROMATOGRAFIA SU COLONNA



Fonte: Principi di Metodologia Biochimica, Ed. Piccin, 2009

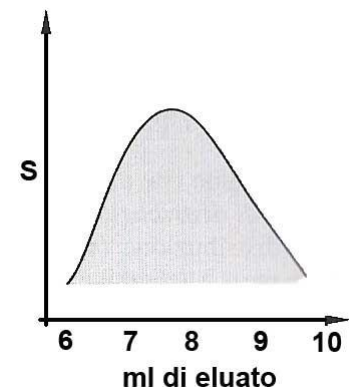
Colonna: 6 cm altezza e 1 cm diametro

Fase mobile liquida circonda fase stazionaria in quantità 1 ml/cm altezza →
divisibile in 6 zone

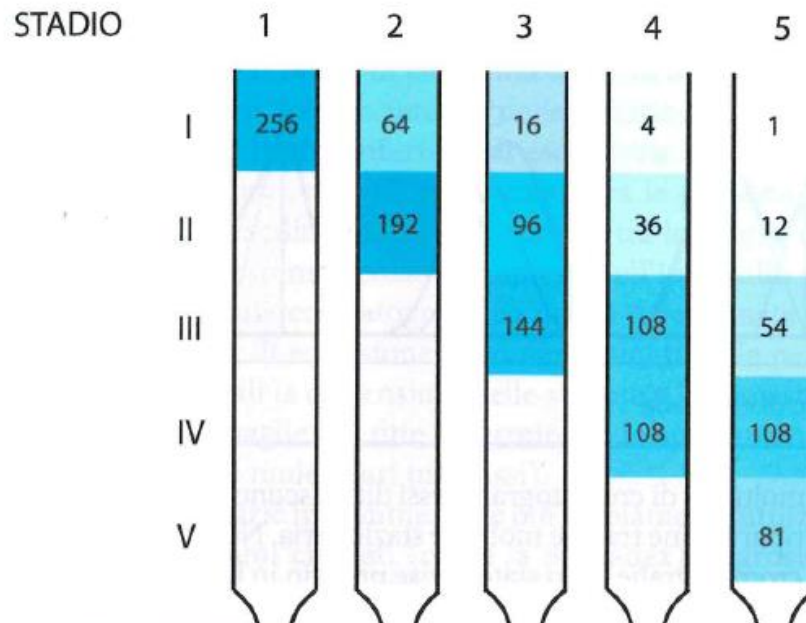
$K_d=1$

Il composto si distribuisce simmetricamente lungo la colonna, con una banda + concentrata al centro secondo una gaussiana.

Grafico [S] in funzione del volume eluato (o tempo di eluizione) → cromatogramma con area picco proporzionale alla concentrazione



CROMATOGRAFIA SU COLONNA



→ Il composto si scioglie di più nella fase mobile

Fonte: Metodologie Biochimiche, Ed. Casa Editrice Ambrosiana, 2012

La massima concentrazione della molecola si ha nel volume IV dello stadio 5.

Se avessimo eseguito una cromatografia con entrambe le molecole, quella con $K = 1/3$ sarebbe uscita prima.

GRANDEZZE CROMATOGRAFICHE

Tempo di ritenzione: tempo che passa tra l'applicazione del campione e il rilevamento dell'uscita di un componente dalla colonna (tempo di ritenzione **assoluto**; si definisce **relativo** quando è riferito a un altro componente di riferimento, o anche il fronte solvente).

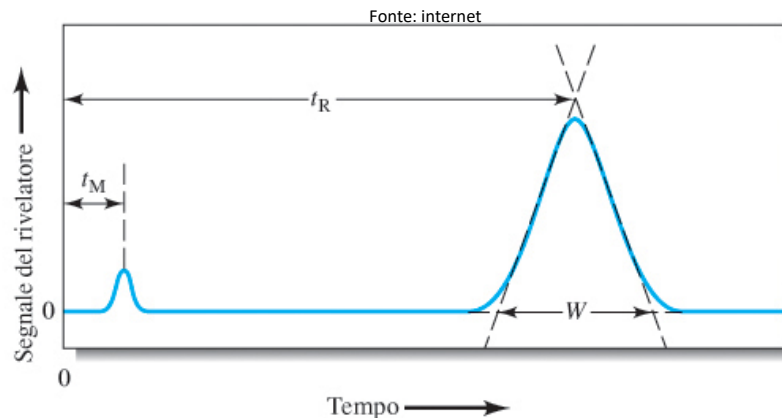
Risoluzione: distanza tra il centro di due picchi di eluizione; misura la capacità e l'efficacia di effettuare una separazione netta dei diversi componenti di una soluzione.

Dipende da tre fattori:

1. **Selettività**, capacità di eluire specie chimiche diverse a velocità diverse;
2. **Capacità**, quantità di materiale che può essere risolto senza sovrapporre i picchi;
3. **Efficienza**, capacità del sistema di raggruppare tutte le molecole di un determinato soluto in un ristretto volume di eluizione (dipende dai piatti teorici).

CROMATOGRAFIA SU COLONNA

Un parametro per la definizione dell'**efficienza** di una cromatografia (potere di discriminare le varie molecole di una miscela) è il **numero dei piatti teorici**, una rappresentazione teorica degli equilibramenti ai quali vanno incontro le molecole che attraversano il sistema cromatografico.



Maggiore sarà il loro numero, più elevata sarà l'efficienza della colonna cromatografica.

$$N = 16 * (t_R/W)^2 \text{ oppure } N = 5,54 (t_R/W_{1/2})^2$$

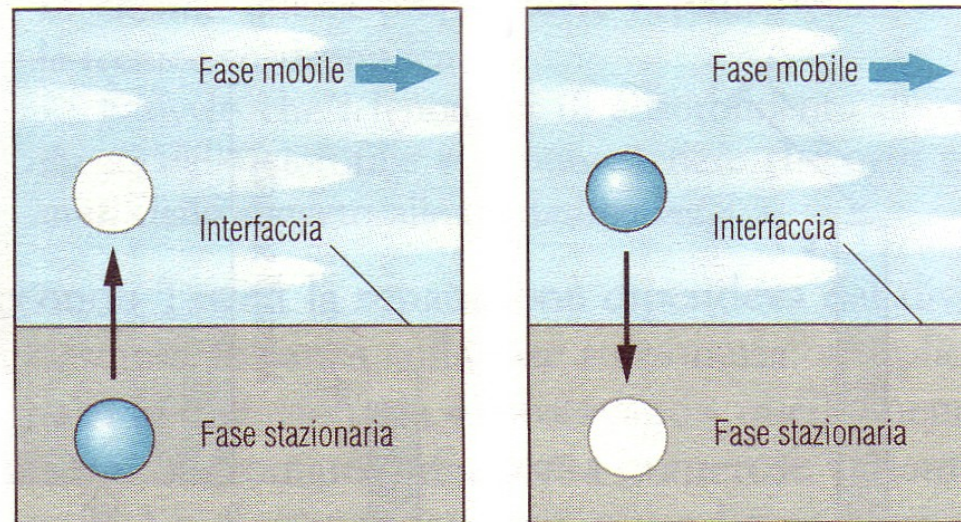
t_R = tempo di ritenzione

W = ampiezza alla base del picco

$W_{1/2}$ = ampiezza a metà altezza picco

Anche altri parametri caratterizzano il comportamento del soluto nella colonna.

CROMATOGRAFIA SU COLONNA

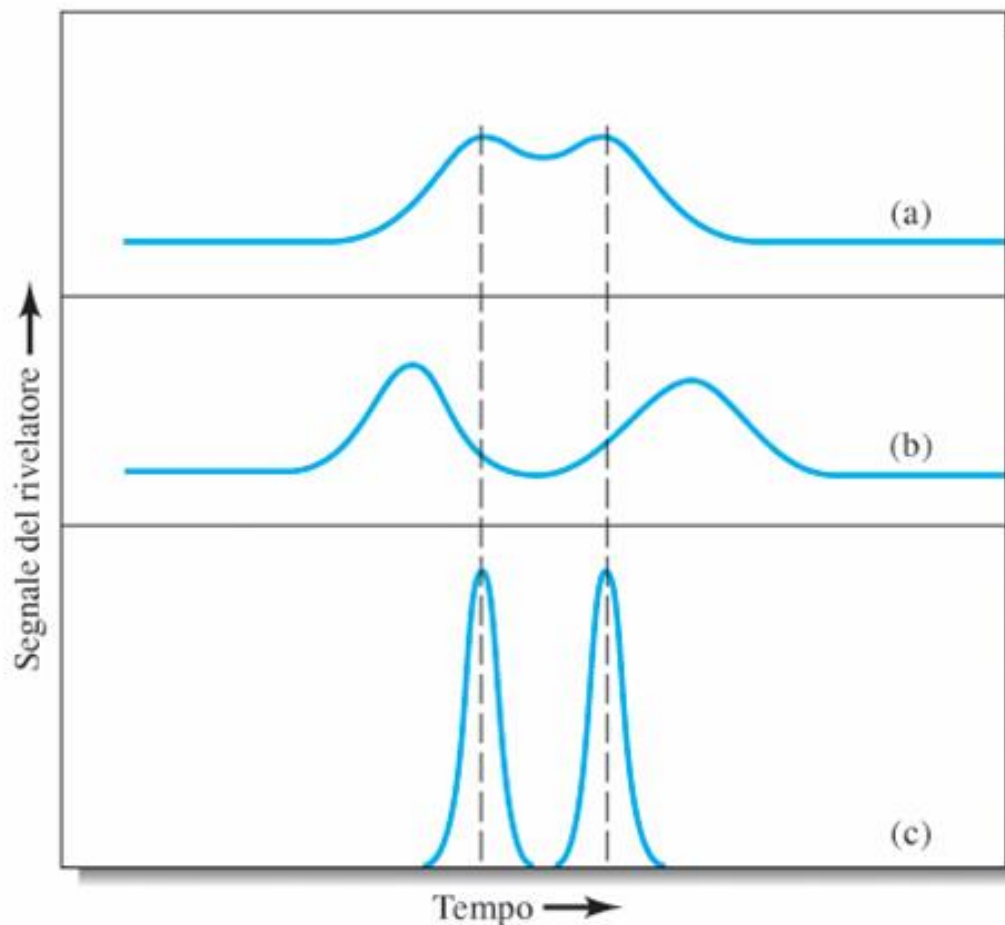


Durante l'eluizione in ogni punto della colonna la sostanza è coinvolta in un processo dinamico di trasferimento tra le due fasi: dalla fase mobile alla fase stazionaria e viceversa.

Il **tempo di eluizione** dipende dal tempo che ogni componente della miscela trascorre nella fase stazionaria.

EFFICIENZA CROMATOGRAFICA

Fonte: Internet



- a) separazione con scarsa risoluzione e basso N
- b) migliora la risoluzione ma è sempre basso N
- c) ottima risoluzione e buono N → **separazione ottimale**

CROMATOGRAFIA: INTERAZIONE SOLUTO-FASE STAZIONARIA/MOBILE

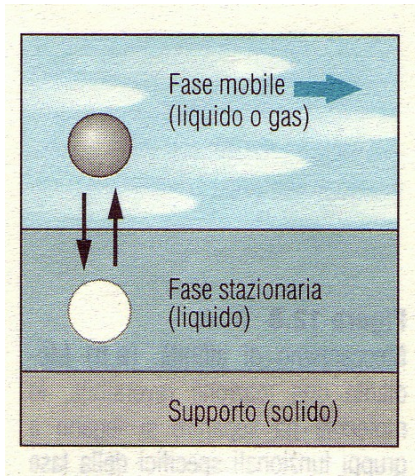
Le interazioni che si verificano tra le sostanze da separare e le due fasi (mobile e stazionaria) sono deboli: se così non fosse non ci sarebbe trattenimento sulla fase stazionaria o eluizione. Sono sfruttate a scopo separativo le seguenti interazioni:

- legami a idrogeno
- interazioni dipolo-dipolo
- interazioni dipolo-dipolo indotto
- forze di Van der Waals
- formazione di composti di interazione
- attrazione coulombiana
- interazioni steriche

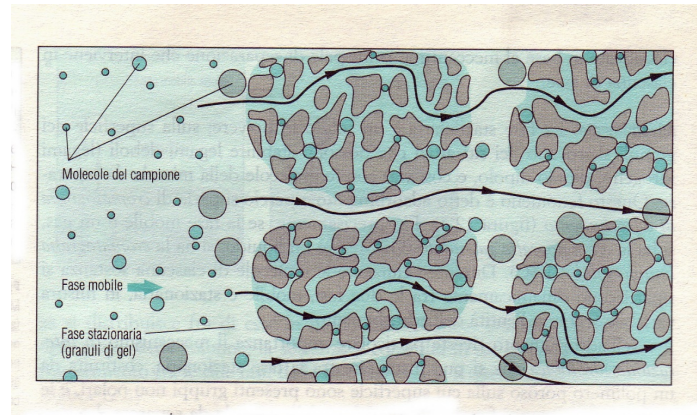
Spesso possono essere presenti più tipi di interazione nello stesso processo cromatografico

MECCANISMI DI SEPARAZIONE

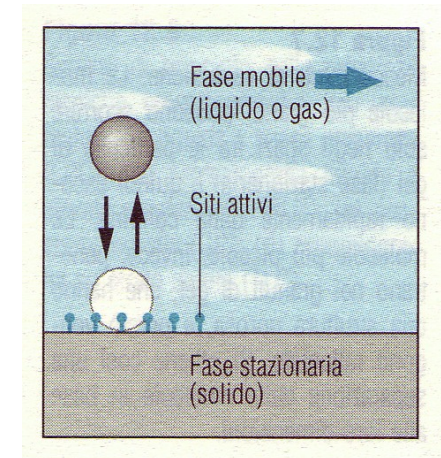
Ripartizione



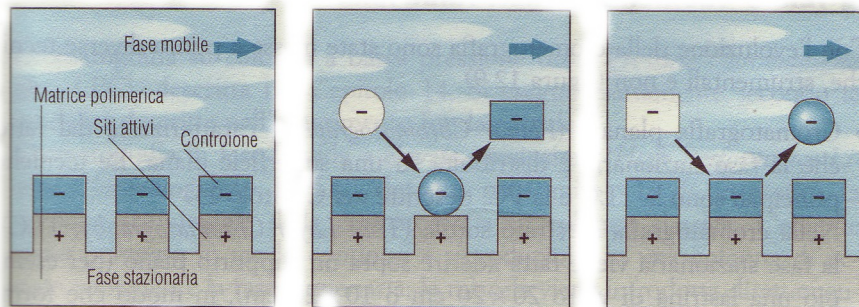
Esclusione



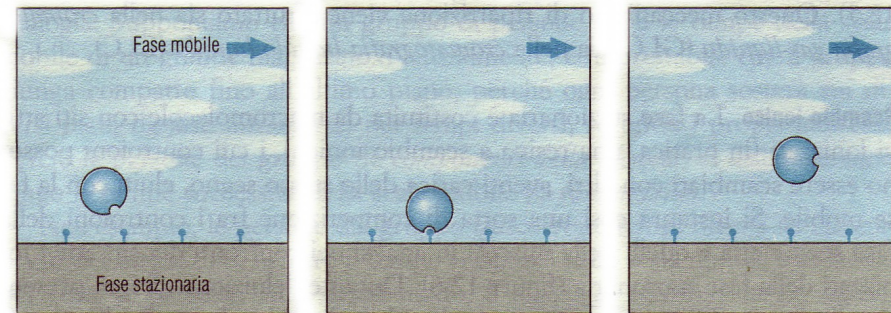
Assorbimento



Scambio ionico

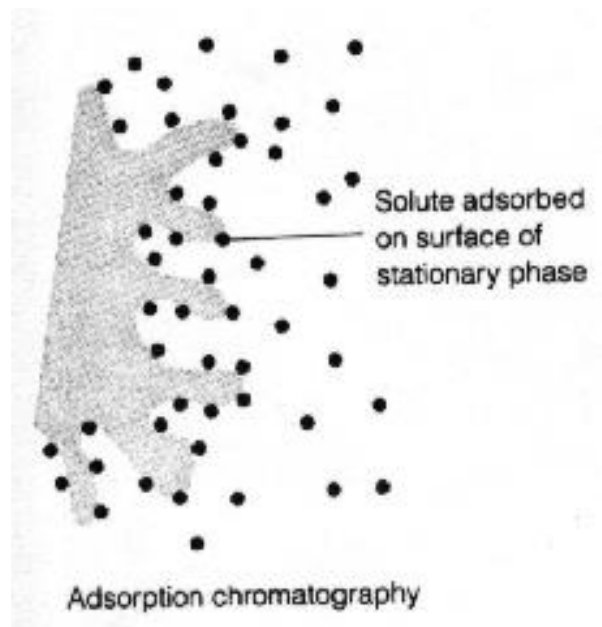


Affinità

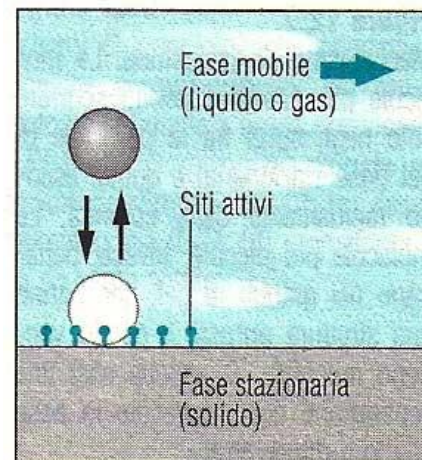


MECCANISMI DI SEPARAZIONE: ADSORBIMENTO

La fase stazionaria è un solido in polvere steso su un supporto; sulla superficie dei granuli si trovano siti attivi che possono stabilire legami deboli (reversibili!) con le molecole della miscela da separare. Si parla quindi di *cromatografia di adsorbimento*, che può essere *gas-solido* o *liquido-solido* a seconda della natura della fase mobile.



Fonte: Analisi chimica strumentale, Ed. Zanichelli, 2000



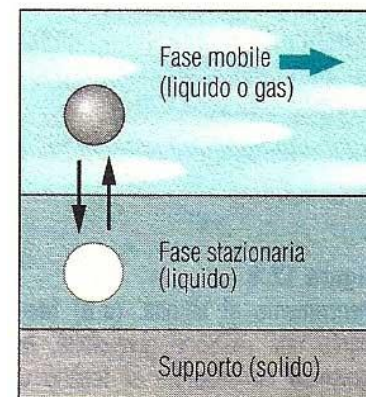
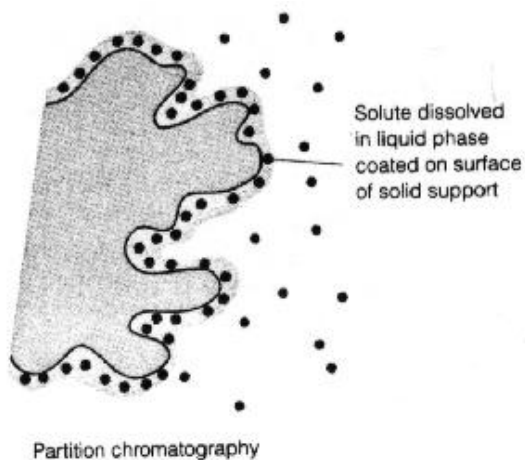
Interazioni idrofobiche

La cromatografia di adsorbimento è utilizzata per separare sostanze neutre polari o non polari, di natura organica o inorganica.

MECCANISMI DI SEPARAZIONE: RIPARTIZIONE

La fase stazionaria è un «liquido» che impregna una matrice inerte solida (supporto): in questo liquido le molecole da separare sono solubili, mentre la fase stazionaria e la fase mobile sono immiscibili.

Durante l'eluizione le molecole si ripartiscono dinamicamente tra le due fasi in base al coefficiente di ripartizione dei soluti nelle 2 fasi: si parla quindi di ***cromatografia di ripartizione*** (*gas-liquido* o *liquido-liquido*).



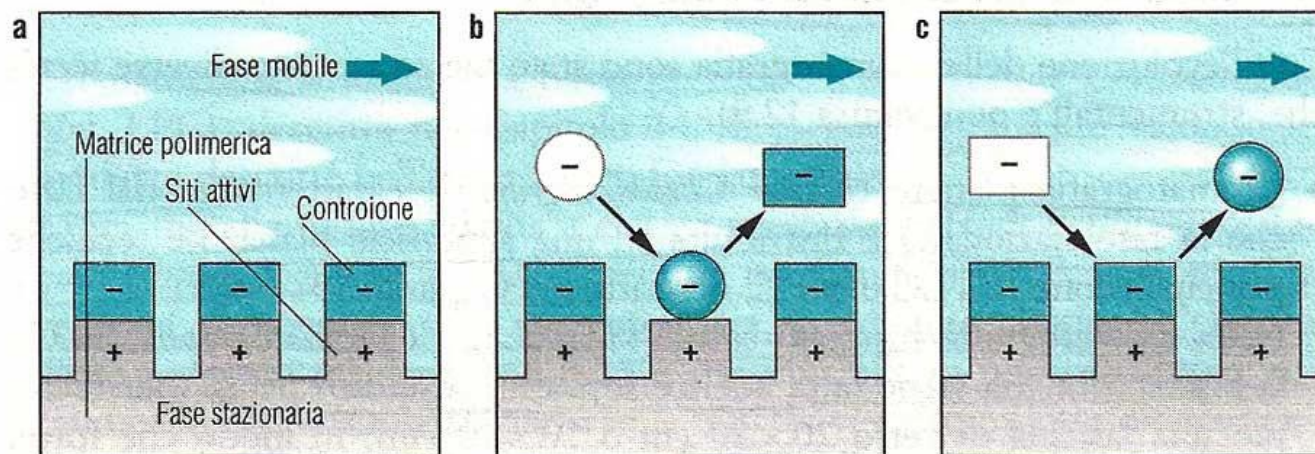
Fonte: Analisi chimica strumentale, Ed. Zanichelli, 2000

Due tipi:

- ***fase normale***, fase stazionaria è più polare (es. acqua) della fase mobile;
- ***fase inversa***, fase stazionaria è meno polare (apolare) della fase mobile. Si tratta della tecnica più comunemente impiegata per la separazione di sostanze organiche

MECCANISMI DI SEPARAZIONE: SCAMBIO IONICO

La fase stazionaria è costituita da un polimero inerte contenente siti attivi ionizzati, i cui controioni possono essere scambiati con altri ioni aventi carica dello stesso segno. Il meccanismo di separazione è basato sulla competizione per i siti di scambio, presenti sulla fase stazionaria, tra i controioni presenti nella fase mobile e quelli presenti nel campione. Si parla di ***cromatografia di scambio ionico***.



Fonte: Analisi chimica strumentale, Ed. Zanichelli, 2000

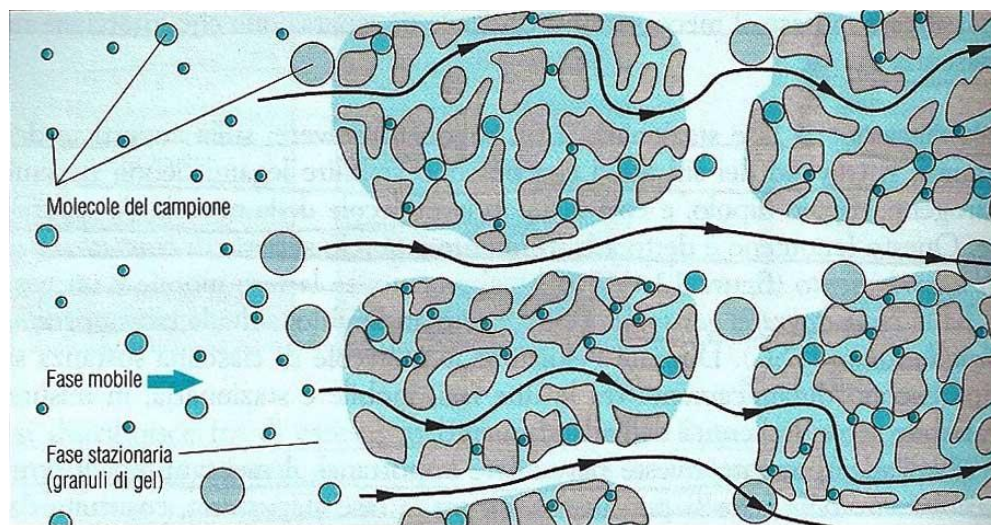
Due tipi di scambio ionico:

- a)** Resine cationiche, deboli o forti → scambiano cationi (sono cariche negativamente)
- b)** Resine anioniche, deboli o forti → scambiano anioni (sono cariche positivamente)

MECCANISMI DI SEPARAZIONE: ESCLUSIONE MOLECOLARE O GEL FILTRAZIONE

La fase stazionaria è un solido poroso o un gel con pori di dimensioni variabili in base alla composizione chimica e alla preparazione della matrice.

Le molecole dell'analita, disciolte nella fase mobile, penetrano nei pori se le loro dimensioni sono compatibili e vi rimangono per un certo tempo; le molecole più grandi sono invece escluse dai pori ed escono dalla colonna in tempi brevi → **le molecole piccole sono ritardate dal gel**



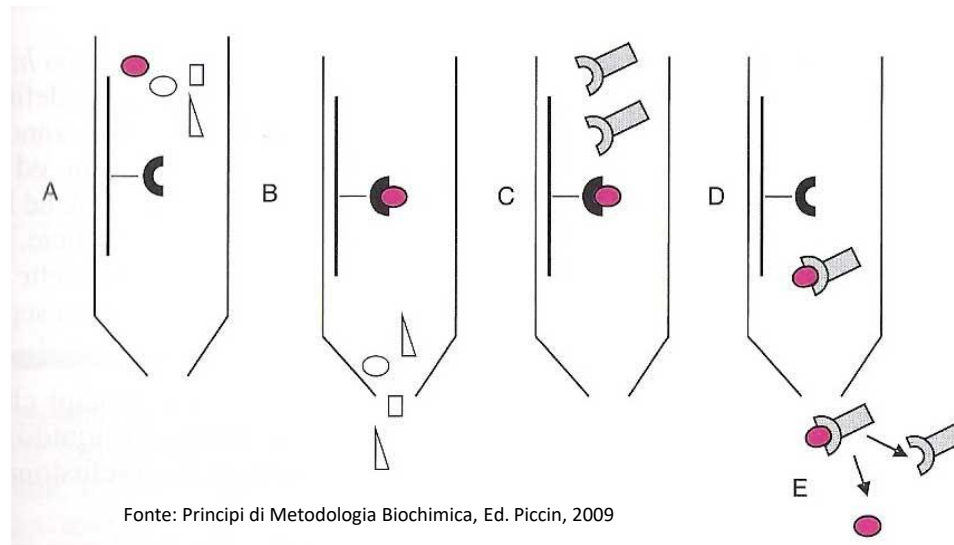
Fonte: Analisi chimica strumentale, Ed. Zanichelli, 2000

Si parla di ***cromatografia di esclusione o gel filtrazione***.

La tecnica è impiegata per la separazione di molecole di grandi dimensioni (es miscela di proteine).

MECCANISMI DI SEPARAZIONE: AFFINITA'

In questo caso si utilizzano reazioni di tipo biochimico, reversibili e molto specifiche, in modo che le molecole da separare interagiscano con la fase stazionaria e si ottenga così l'eluizione selettiva di alcuni componenti della miscela. Si parla di ***cromatografia di affinità***.



Sulla fase stazionaria è immobilizzato un ligando (es. anticorpo) → caricando il campione in colonna, solo la molecola che si lega al ligando verrà trattenuta. La proteina viene poi eluita con una opportuna fase mobile.

La cromatografia di affinità è impiegata nella separazione di molecole di interesse prevalentemente biochimico.

TIPI DI CROMATOGRAFIA

In base allo stato fisico della fase mobile possiamo classificare le tecniche cromatografiche in:

- Cromatografia Liquida (LC): la fase mobile è un liquido nel quale sono solubili i componenti della miscela da separare; la fase stazionaria deve essere insolubile nella fase mobile.
- Gas Cromatografia (GC): la fase mobile è un gas che funge da carrier per i componenti della miscela.

In base alla forma del letto cromatografico si possono identificare:

- Cromatografia su colonna: fase stazionaria è contenuta all'interno di una colonna cilindrica.
- Cromatografia planare: la fase stazionaria è distribuita su una superficie piana, che può essere un supporto cartaceo (*cromatografia su carta*, PC) o una lastrina in vetro o altri materiali (*cromatografia su strato sottile*, TLC)

TIPI DI CROMATOGRAFIA

CROMATOGRAFIA PLANARE

Esecuzione semplice: la miscela da separare va depositata sulla superficie, posandone con un tubo capillare una goccia su una linea che segna l'inizio del processo di eluizione.



Fonte: Internet



Il foglio o la lastrina si pongono in una vaschetta contenente la fase mobile che per gravità (modalità *discendente*), per capillarità (modalità *ascendente*) o per diffusione laterale (modalità *orizzontale*) fluisce sulla fase stazionaria trascinando gli analiti e separandoli tra loro.

TIPI DI CROMATOGRAFIA

1. CROMATOGRAFIA PLANARE

Il risultato è spesso visualizzabile sotto forma di macchie colorate, ognuna dovuta a un componente della miscela

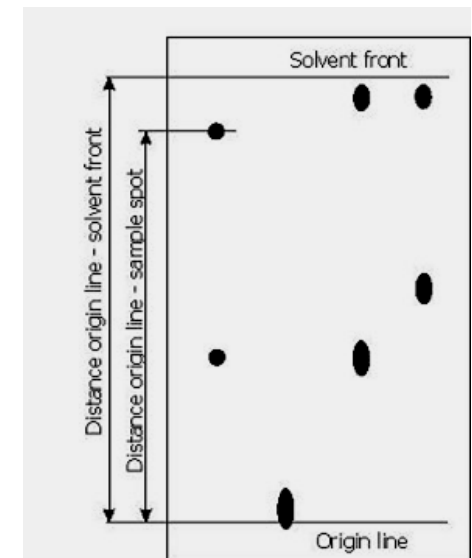
Il riconoscimento delle sostanze può avvenire effettuando separazioni di miscele standard



Il parametro che caratterizza i soluti separati è il cosiddetto R_f o “fattore di ritardo”, ottenuto misurando la **distanza percorsa dal centro della macchia** e confrontandola con la **distanza percorsa dal fronte dell'eluente**:

$$R_f = \frac{d_{analita}}{d_{eluente}}$$

Il valore di R_f degli analiti è quindi sempre compreso tra 0 e 1

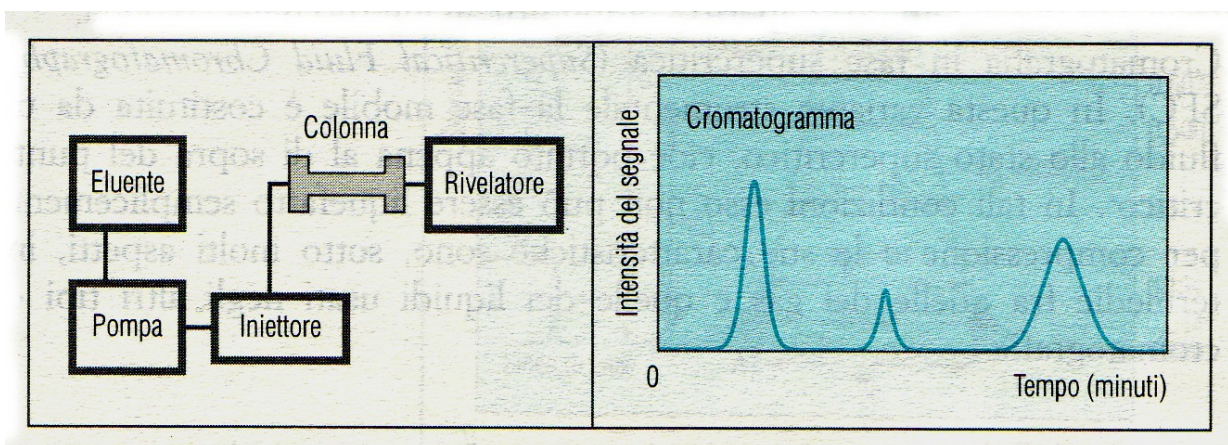


TIPI DI CROMATOGRAFIA

2. CROMATOGRAFIA LIQUIDA SU COLONNA - HPLC

E' possibile realizzare micro-colonne di alcuni cm di lunghezza, in grado di separare in pochi minuti molte sostanze. Le colonne sono costituite da particelle di 1-5 μm di diametro, che richiedono pressioni molto alte per forzare il passaggio dell'eluente attraverso la colonna:

Cromatografia Liquida ad Alte Pressioni o Alte Prestazioni (HPLC).



Fase stazionaria: solido su colonna
con pressione

Fase mobile: liquido

Adsorbimento

Ripartizione

Scambio ionico

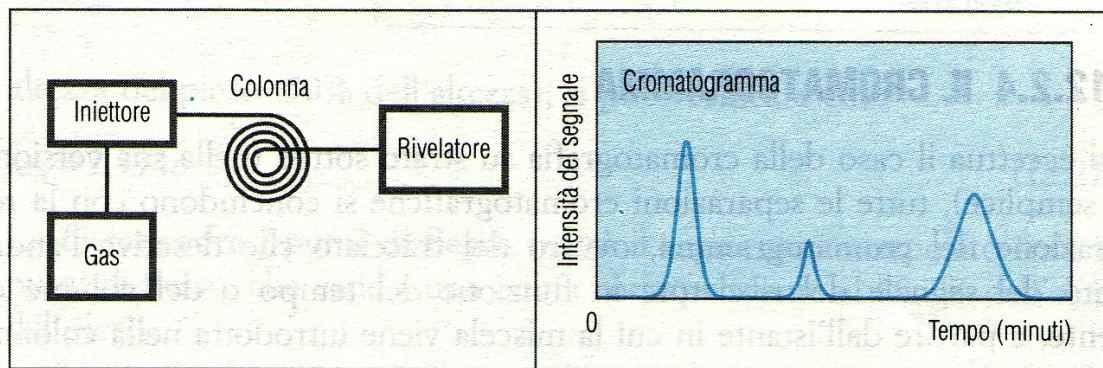
HPLC

TIPI DI CROMATOGRAFIA: 3. GASCROMATOGRAFIA

Impiegata per la separazione di sostanze volatili. Si presta meno facilmente a misure quantitative rispetto alla LC, ma ha maggiori potenzialità dal punto di vista diagnostico.

Si possono separare sostanze appartenenti a varie classi tra cui:

- Aromi (terpeni, esteri)
- Idrocarburi a corta catena
- Acidi carbossilici
- Composti di interesse biochimico



I composti iniettabili in un sistema GC devono avere $T_{eb} < 300^{\circ}\text{C}$ e non devono essere *termolabili*

Fase stazionaria: solido

Fase mobile: gas

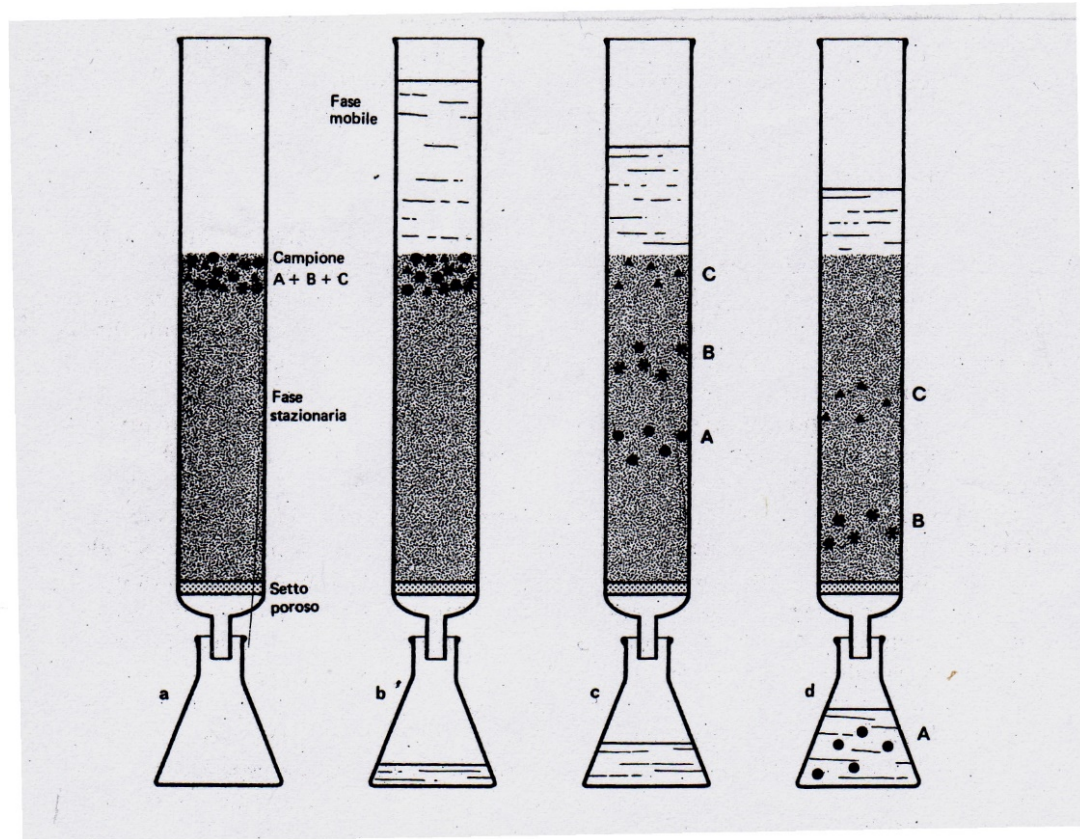
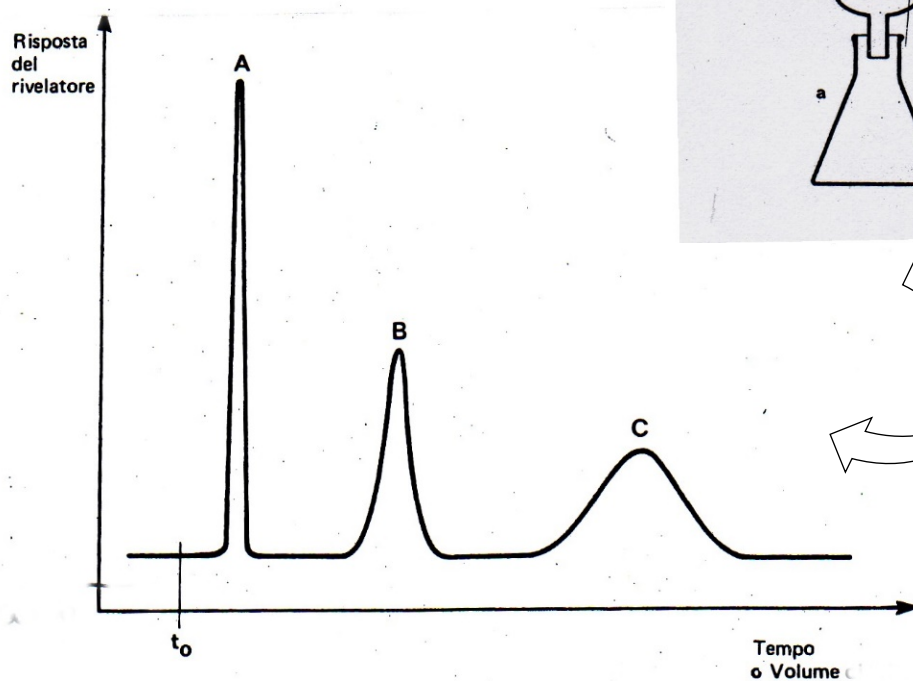
Fase stazionaria: liquido

Fase mobile: gas

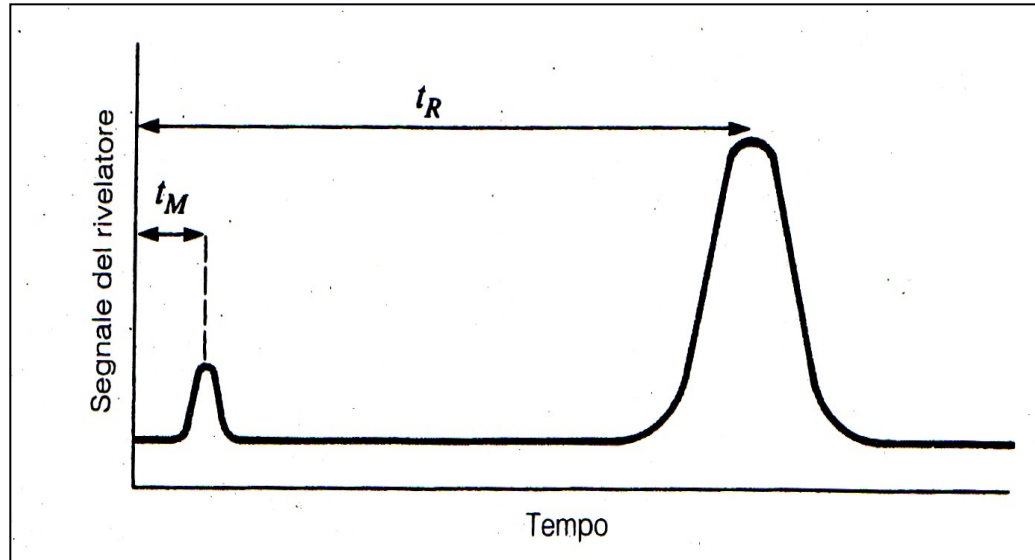
Adsorbimento **GC**

Ripartizione **GC su colonne capillari**

Separazione di tre componenti



Tempo di ritenzione e tempo morto



t_R = tempo di ritenzione

t_M = tempo morto

v = velocità di un analita = $\frac{L}{t_R}$ dove L è la lunghezza della colonna

u = velocità della fase mobile = $\frac{L}{t_M}$

Relazione tra la costante di ripartizione e il tempo di ritenzione

$$v = u \frac{\text{moli di analita nella fase mobile}}{\text{moli totali di analita}}$$

$$v = u \frac{C_M V_M}{C_M V_M + C_S V_S}$$

$$v = u \frac{1}{1 + K \frac{V_S}{V_M}}$$

dove

$$K = \frac{C_S}{C_M}$$

fattore di capacità (k o K')

Relazione tra la costante di ripartizione e il tempo di ritenzione

se $k = K \frac{V_S}{V_M}$

si ottiene:

$$v = u \times \frac{1}{1 + k}$$

Si sostituiscono ora v e u in funzione della lunghezza della colonna e dei tempi

$$\frac{L}{t_R} = \frac{L}{t_M} \times \frac{1}{1 + k}$$

da cui $t_R = t_M (1 + k)$

e infine

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

dove k (o K') è il **fattore di capacità o fattore di ritenzione**

Fattore di capacità (fattore di ritenzione) k

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

Il valore del fattore di ritenzione deve essere compreso tra 1 e 5.

Se $k < 1$ l'eluizione è troppo veloce; se $k > 5$ i tempi di analisi si allungano troppo

k (K') dipende da:

- temperatura
- natura delle due fasi
- caratteristiche dell'impaccamento
- granulometria
- spessore della fase stazionaria

Non dipende da:

- lunghezza della colonna
- flusso della fase mobile

Selettività

La selettività (α) è la capacità di eluire specie chimiche diverse in modo da ottenere picchi separati.

$$\alpha = \frac{K_B}{K_A}$$

dove K_B è la costante di distribuzione della specie più trattenuta.

Riarrangiando si ha:

$$\alpha = \frac{k_B}{k_A}$$

e quindi

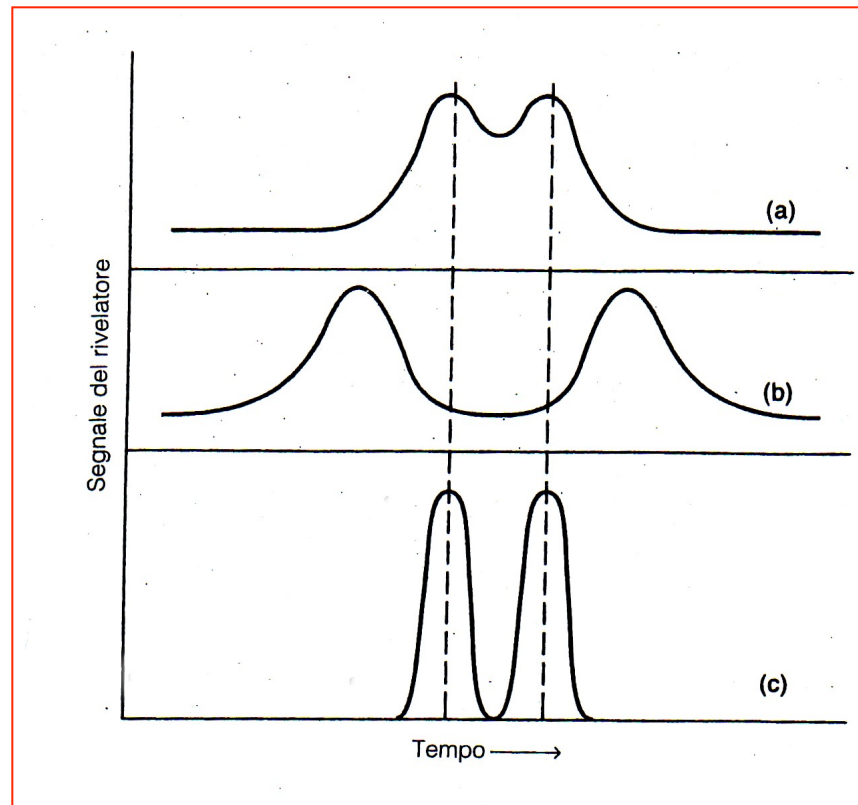
$$\alpha = \frac{(t_R)_B - t_M}{(t_R)_A - t_M}$$

α dipende dal meccanismo della separazione cromatografica deve essere $\alpha > 1$

Efficienza

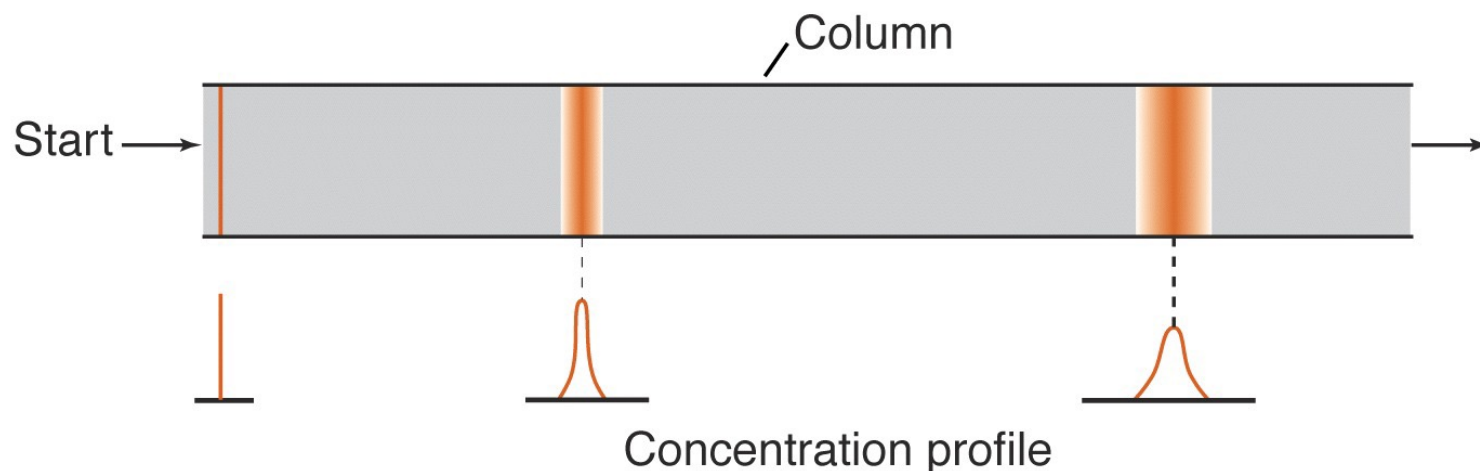
Oltre alla **selettività** occorre sempre considerare anche il concetto di **efficienza** (vedi slide precedenti)

L'efficienza indica la capacità di un sistema cromatografico di eluire tutte le particelle di una data specie chimica con la stessa velocità in modo da formare bande strette che danno poi luogo a picchi stretti.



Teoria di Martin e Syngde

L'efficienza di una colonna dipende dal numero di piatti teorici (N) e dall'altezza di un piatto teorico (H). Il piatto teorico è il tratto di colonna in cui una data specie si trova in equilibrio tra la fase mobile e la fase stazionaria.



Considera la colonna divisa in un numero (N) di segmenti adiacenti immaginari chiamati **piatti teorici**

All'interno di ciascun piatto teorico l'analita è in equilibrio tra la fase stazionaria e la fase mobile.

Teoria di Martin e Syngue: piatti teorici

Così come una colonna di distillazione ha dei piatti reali, sui quali si instaura un equilibrio fra liquido e vapore (che si arricchisce del componente più volatile, man mano che sale lungo la colonna), una colonna cromatografica può essere pensata come l'insieme di N **piatti teorici**, definiti come il tratto di colonna in cui una data specie chimica si trova in equilibrio fra le due fasi (mobile e stazionaria), prima che l'eluente la trascini verso il piatto successivo

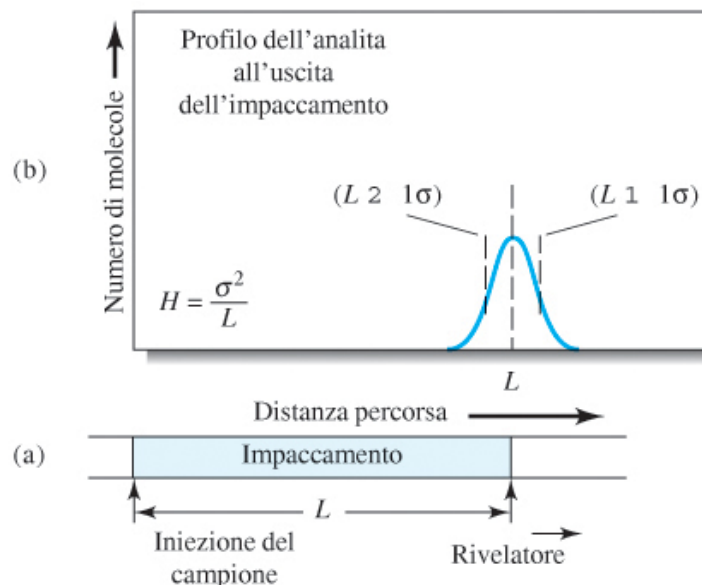
$$N = \frac{L}{H}$$

N = numero di piatti

L = lunghezza della colonna

H = altezza di un piatto teorico

Figura 30-11 Definizione dell'altezza del piatto, $H = \sigma^2/L$. In (a), la lunghezza della colonna è mostrata come distanza tra il punto di ingresso del campione e il rivelatore. In (b) è mostrata la distribuzione Gaussiana delle molecole del campione.



$$H = \frac{\sigma^2}{L}$$

CALCOLO NUMERO PIATTI TEORICI

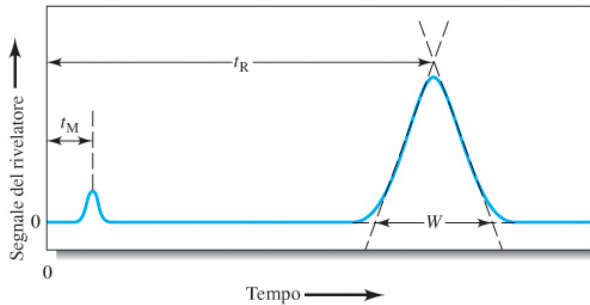


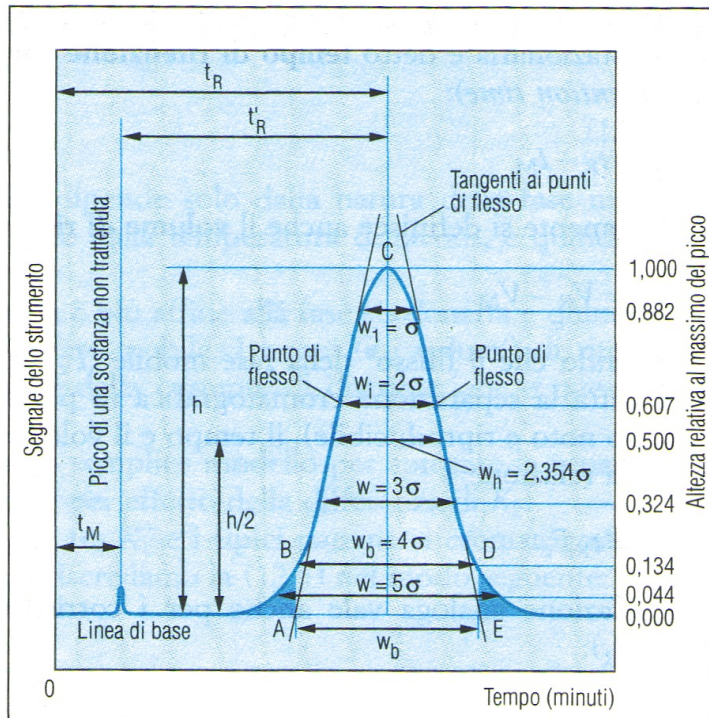
Figura 30-12 Determinazione del numero

dei piatti, $N = 16 \frac{I_R}{W} b^2$.

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W} \right)^2$$

w = ampiezza alla base

oppure



$$N = 5,545 \left(\frac{t_R}{w_h} \right)^2$$

w_h = ampiezza a metà altezza

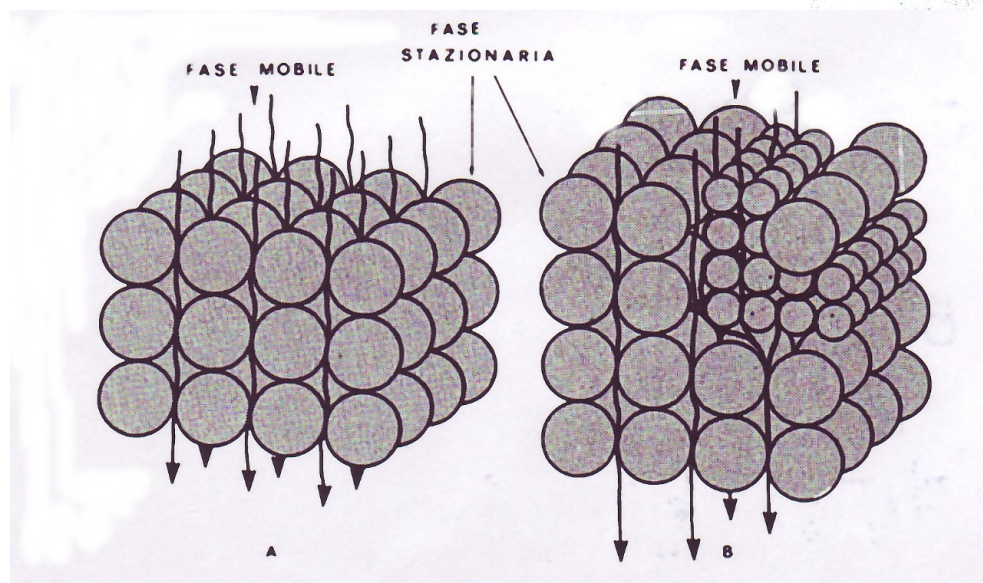
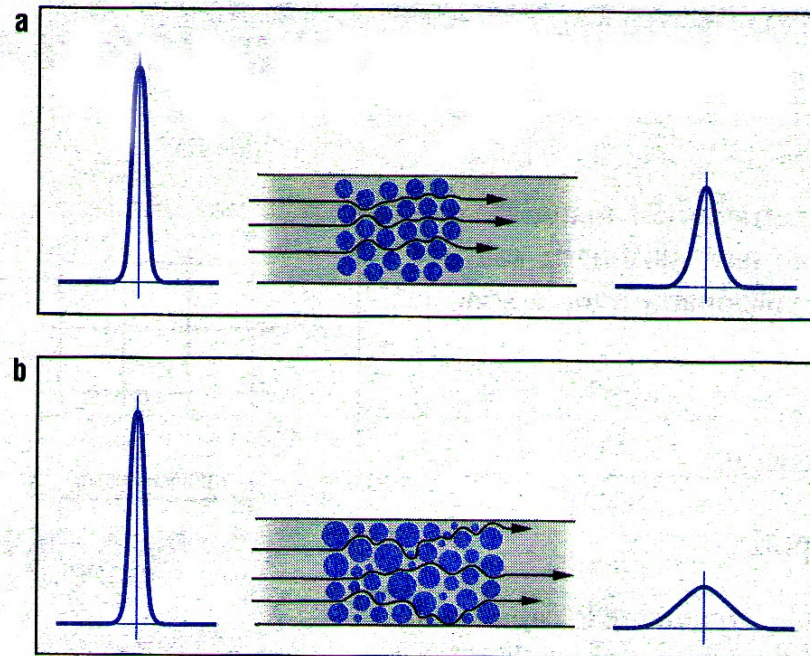
Teoria del non-equilibrio di Giddings o teoria dell'allargamento di banda

Si affronta il problema della separazione cromatografica da un punto di vista dinamico studiando l'influenza della velocità della fase mobile sull'altezza del piatto teorico.

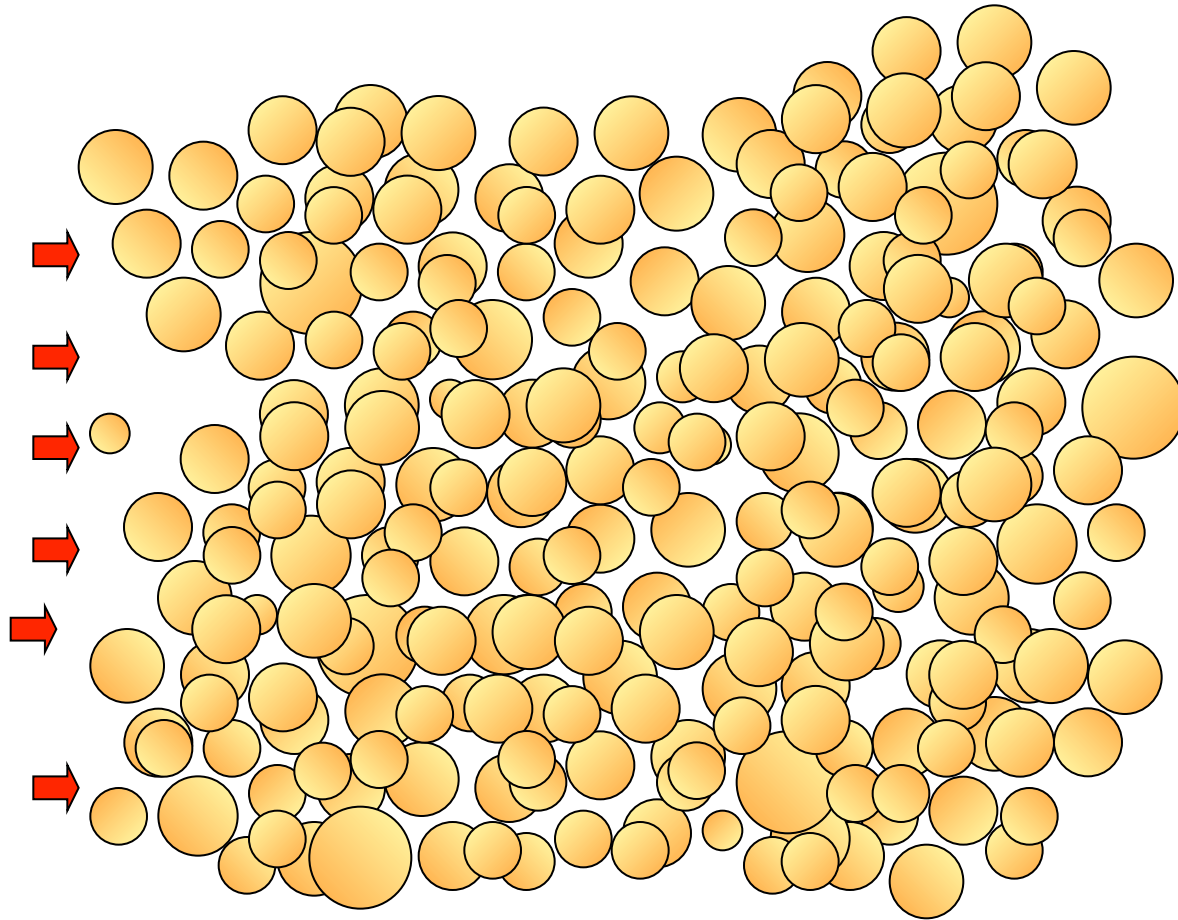
Sono tre le cause di allargamento delle bande:

- Percorsi multipli
- Diffusione molecolare longitudinale
- Trasferimento di massa

■ Percorsi multipli



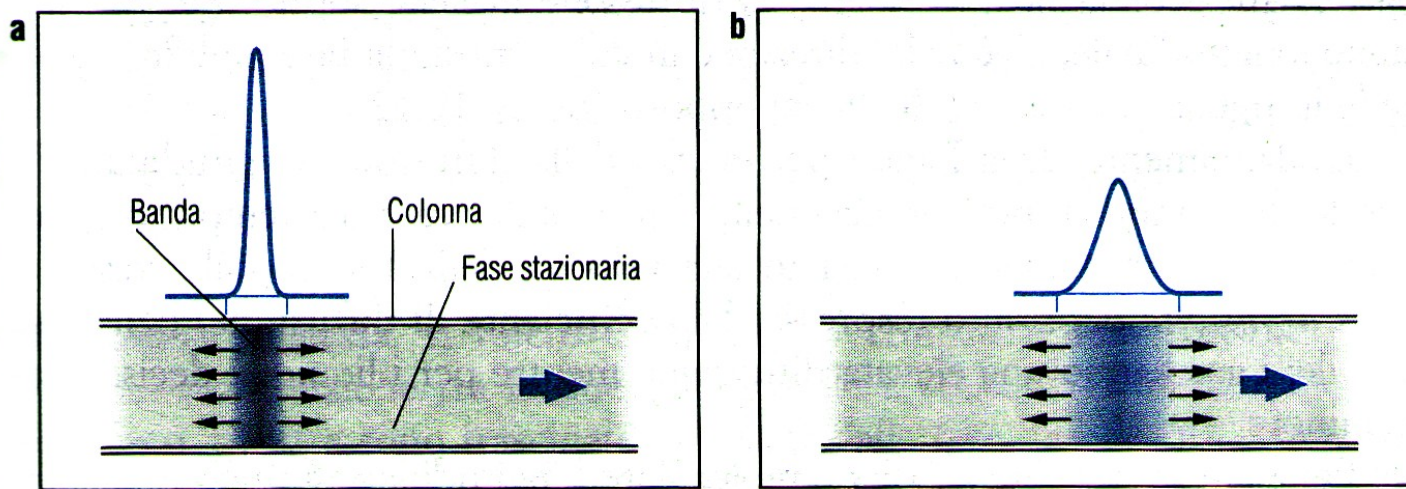
Percorsi multipli



Due soluzioni teoricamente possibili:

- utilizzare particelle molto piccole, in modo che i vari cammini risultino poco differenti
- utilizzare particelle con granulometria costante

■ Diffusione molecolare longitudinale



Zone of solute after short time on column

Longitudinal diffusion (B/u_x)



Zone of solute after longer time on column

Direction of travel

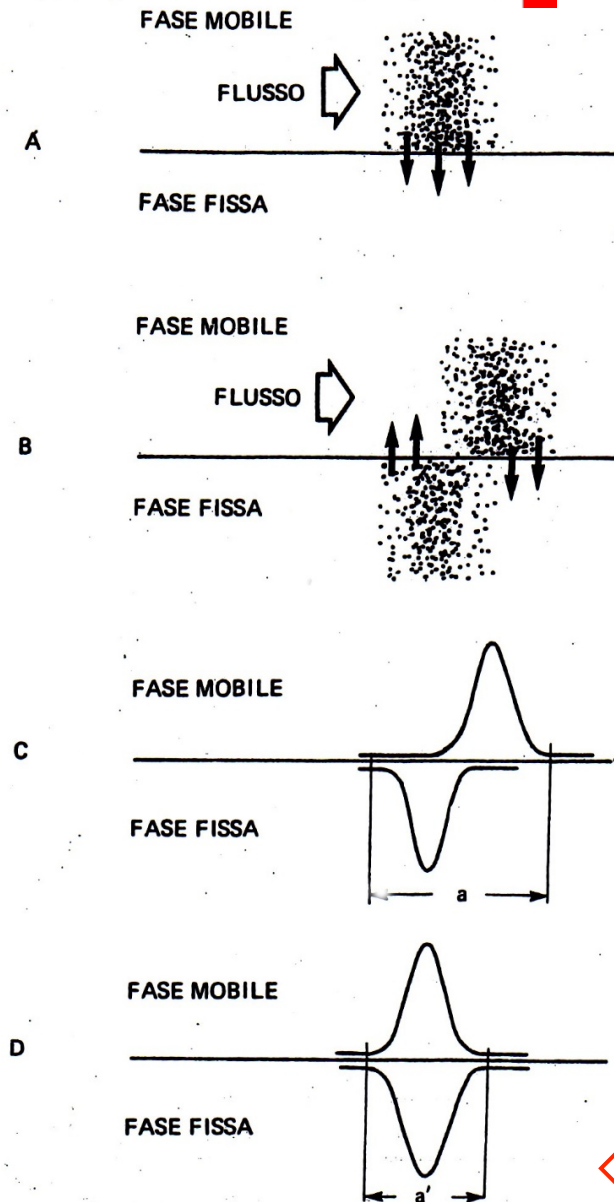
Le molecole della sostanza diffondono sia nella fase mobile sia in quella stazionaria. Tendono cioè a passare spontaneamente da zone a concentrazione più alta a quelle a concentrazione più bassa secondo una direzione longitudinale, quella appunto di avanzamento della fase mobile.

■ Trasferimento di massa

Questo fattore deriva dal **tempo finito** che è necessario al soluto per raggiungere l'equilibrio tra fase stazionaria e fase mobile.

Il fenomeno è tanto più favorito quanto meno è viscosa la fase e per questo stesso motivo è più accentuato nella fase mobile che in quella stazionaria.

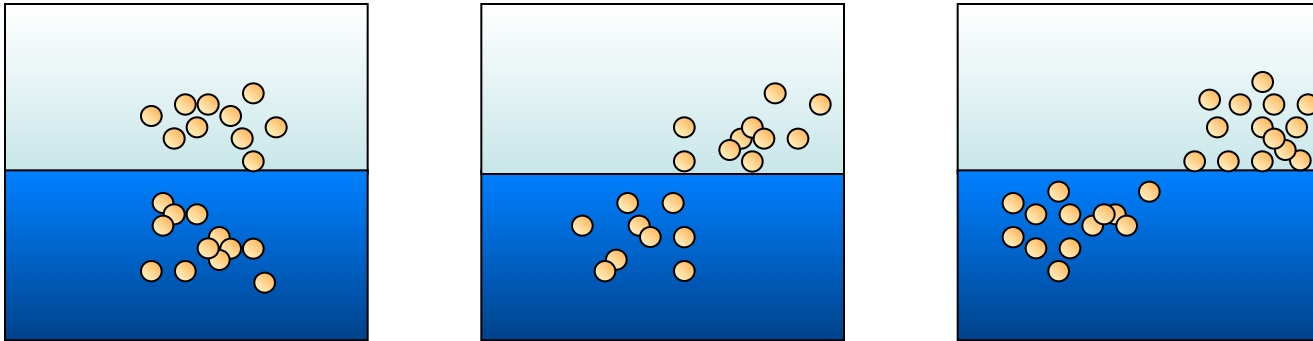
Per minimizzare questo fenomeno occorrono flussi elevati (ma non troppo perché si possono verificare problemi per la pressione) e fluidi viscosi; anche le basse temperature aiutano poiché aumentano la viscosità delle fasi.



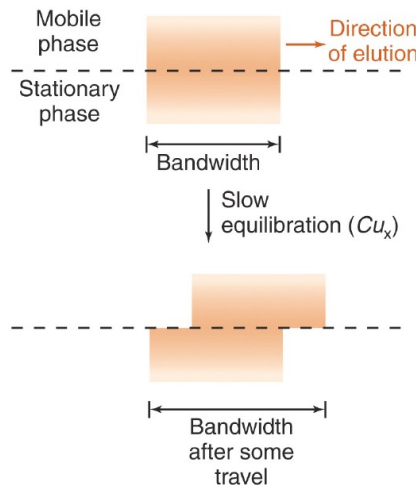
← situazione teorica ideale

■ Trasferimento di massa

Per esempio, in gascromatografia, sarà molto più semplice il passaggio nella fase gassosa che in quella liquida, che è più densa e viscosa.



Poiché la fase gassosa va costantemente avanti, con il tempo lo sbilanciamento diviene più marcato e si avrà un progressivo allargamento della banda



Altezza equivalente piatto teorico in GC e in HPLC

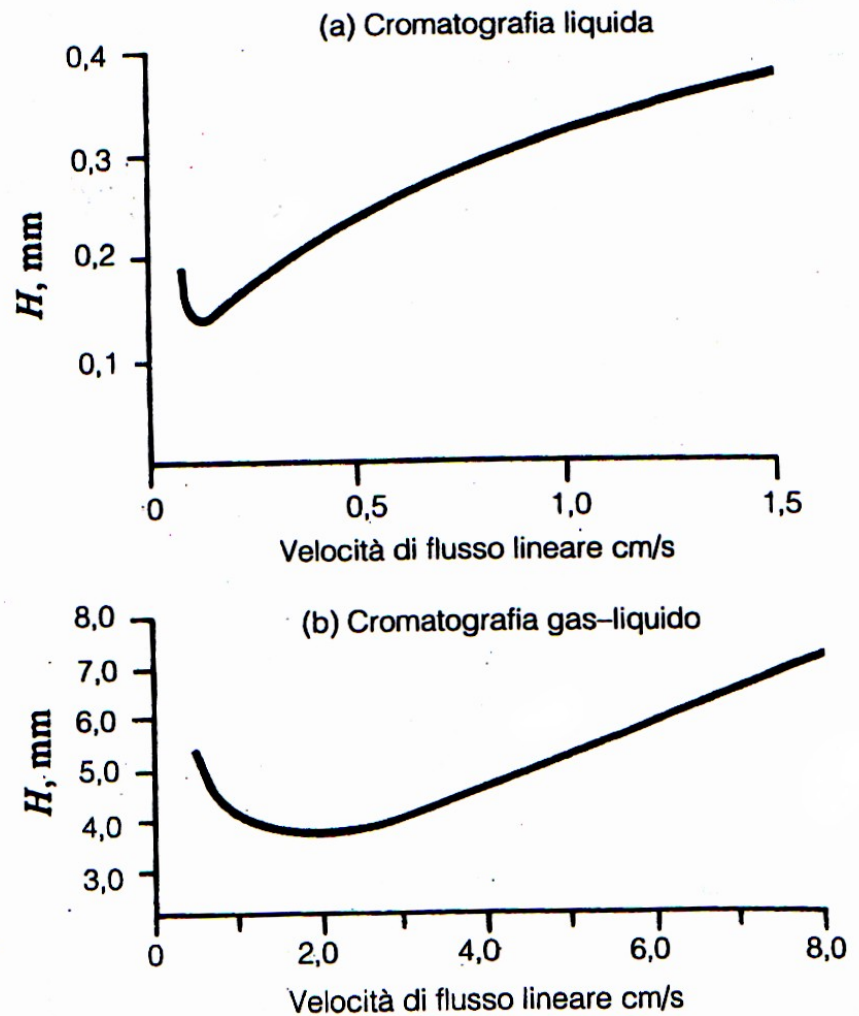
In queste curve il valore delle ordinate è molto diverso.

L'equazione che rappresenta curve di questo genere è del tipo:

$$y = a + \frac{b}{x} + c \times x$$

H = altezza equivalente piatto teorico

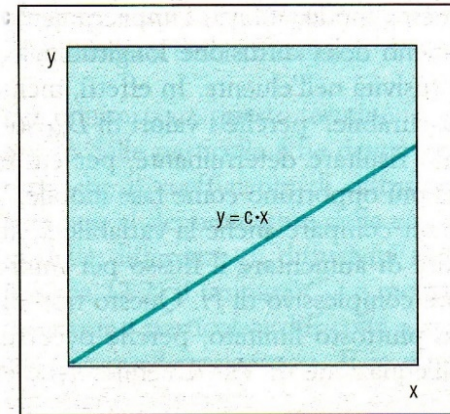
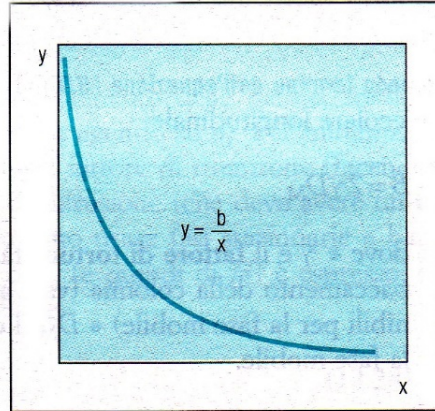
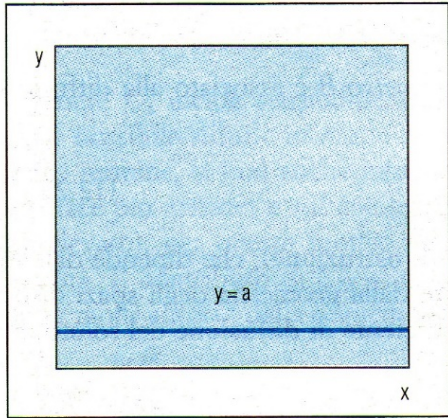
x = velocità di flusso lineare



Altezza equivalente piatto teorico in GC e in HPLC

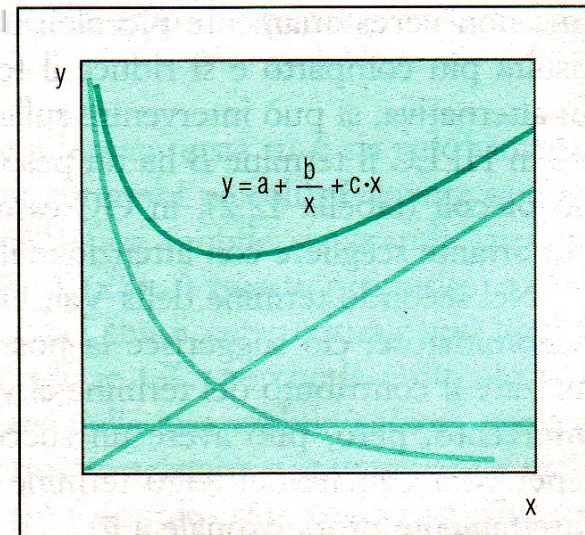
$$y = a + \frac{b}{x} + c \times x$$

La funzione è la combinazione lineare di tre diverse funzioni



y = altezza equivalente piatto teorico

x = velocità di flusso lineare



Equazione di Van Deemter

$$H = A + \frac{B}{u} + C \cdot u$$

dove **H** è l'altezza del piatto teorico e **u** è la velocità media della fase mobile.

I valori A, B e C dipendono dalla tecnica cromatografica utilizzata

Il termine A

$$A = 2\lambda d_p$$

dove λ è una costante associata alla granulometria e all'impaccamento della colonna e d_p è il diametro medio delle particelle della fase stazionaria.

Il primo termine della Van Deemter è indipendente dal flusso della fase mobile.

Per minimizzare questo termine occorre:

- ridurre il diametro delle particelle della fase stazionaria
- minimizzare le variazioni nella granulometria;
- migliorare l'impaccamento.

Il termine **B**

$$B = 2\gamma D_M$$

dove γ è il fattore di tortuosità (dipende dall'impaccamento della colonna) e D_M è il coefficiente di diffusione del soluto nella fase mobile.

Per ridurre il valore di γ bisogna usare particelle di dimensioni uniformi. Si può intervenire sulla diffusività nell'eluente.

In HPLC B ha un peso trascurabile perché i valori di D_M sono piccoli, mentre in GC bisogna fare attenzione al gas che si utilizza.

Il secondo termine della Van Deemter è inversamente proporzionale al flusso e quindi si potrebbe pensare di diminuirlo; occorre però tenere conto anche del terzo termine.

Il termine $C \times u$

Il terzo termine da cui dipende l'efficienza di una colonna è associato alla resistenza al **trasferimento di massa**: un equilibrio ha bisogno di tempo per instaurarsi

Il suo contributo al valore complessivo di H è il più importante di tutti gli altri.

Più è bassa la velocità di flusso dell'eluente, più velocemente il trasferimento di massa raggiungerà l'equilibrio e minore sarà l'allargamento del picco.

Su questo termine incidono tutte le variabili che influenzano il passaggio di una sostanza da una fase all'altra e in particolare: **temperatura**, **viscosità** e **densità**, **area delle superfici** attraverso le quali può avvenire l'equilibratura

Il termine C : $C_S + C_M$

$$C = C_S + C_M$$

dove C_S è legato al trasferimento di massa nella fase stazionaria e C_M al trasferimento di massa nella fase mobile


$$C_S = \frac{qkd_f^2}{(1+k)^2 D_S}$$

k è il fattore di capacità (ritenzione)

q tiene conto della non uniformità della fase stazionaria

d_f è lo spessore massimo della fase stazionaria

D_S è il coefficiente di diffusione nella fase stazionaria

Per minimizzare C_S si deve intervenire su k e sul diametro medio delle particelle (piccolo) mentre D_S deve essere **grande** per cui si utilizzano fasi stazionarie a bassa viscosità

Il termine C : $C_s + C_M$

$$C = C_s + C_M$$


$$C_M = \frac{\omega d_p^2}{D_M}$$

- ω dipende dal tipo di impaccamento e dalla geometria della colonna
- d_p è il diametro delle particelle della fase stazionaria
- D_M è il coefficiente di diffusione nella fase mobile

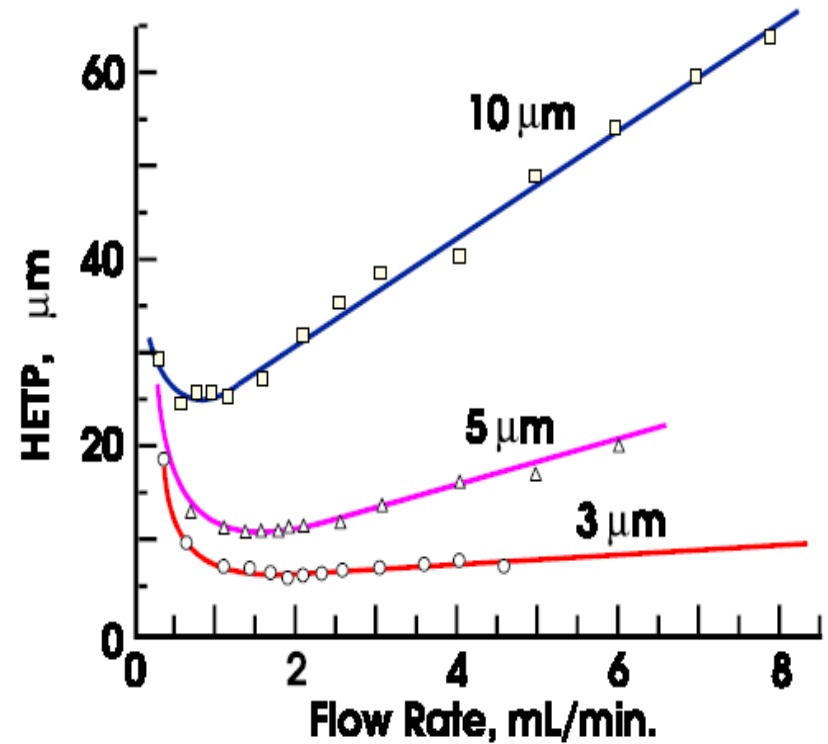
Si può diminuire il diametro medio delle particelle, mentre il coefficiente di diffusione nella fase mobile deve essere grande.

In GC questo termine è quasi trascurabile, mentre è importante per HPLC.

Curva di Van Deemter

Effetto di d_p e del flusso (F) sull'efficienza (HETP)

In HPLC



- Piccole d_p danno HETP più bassi
- Il flusso ottimale è maggiore con d_p più piccole
- Colonne con particelle piccole hanno minor perdita di efficienza a flussi alti

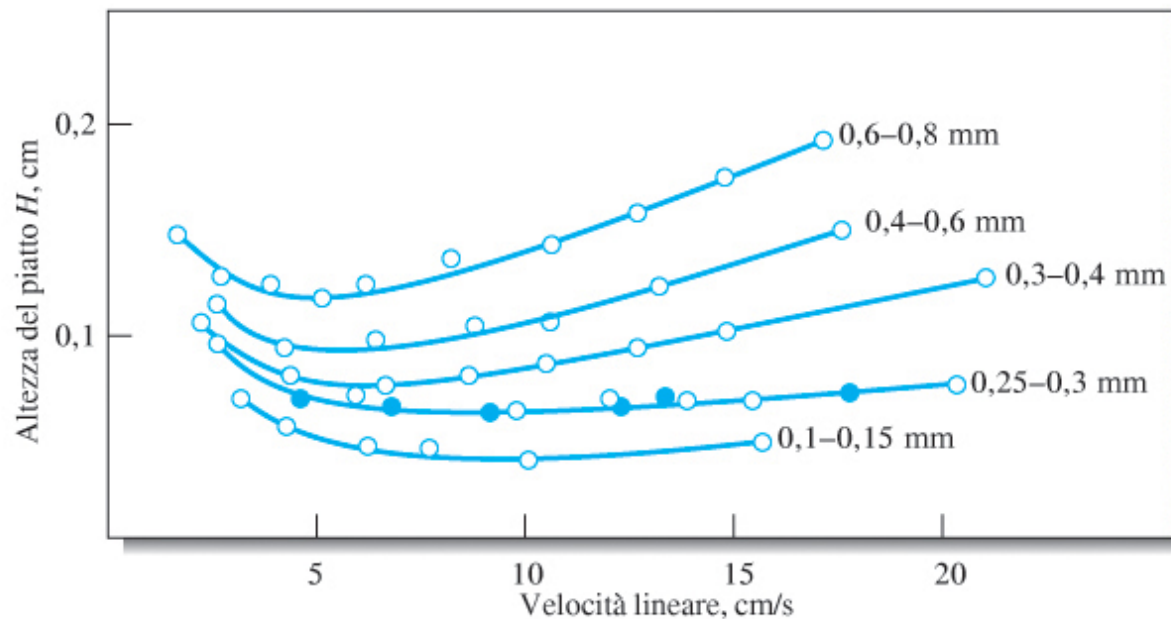
Curva di Van Deemter

Effetto di d_p e del flusso (F) sull'efficienza (HETP)

In GC

Figura 30-16

Effetto della dimensione delle particelle sull'altezza del piatto per colonne impaccate in gas cromatografia. I numeri sulla destra di ogni singola colonna sono i diametri delle particelle. (Da J. Boheman e J.H. Purnell, in *Gas Chromatography*, 1958, D.H. Desty, Ed. New York: Academic Press, 1958).



Eluizione in cromatografia

Problematiche relative a:

- picchi non completamente risolti
- picchi allargati
- tempi lunghi

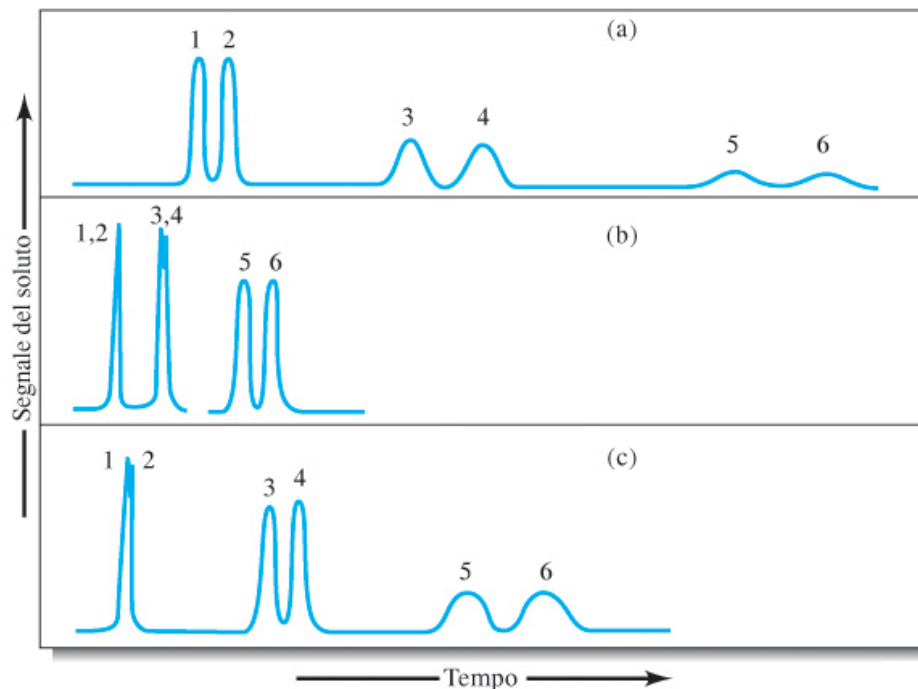


Figura 30-20 Il problema generale della eluizione in cromatografia.

- Eluizione **isocratica**: concentrazione dell'eluente **non cambia** durante il tempo dell'intera eluizione
- Eluizione a gradiente/a step: concentrazione dell'eluente **viene variata ad hoc** durante l'eluizione)