



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
FIRENZE

**DST**

Dipartimento di  
Scienze della Terra



# PRINCIPI DI CROMATOGRAFIA



# INTRODUZIONE

La **CHIMICA ANALITICA**

è la branca della chimica rivolta all'identificazione, caratterizzazione chimico-fisica e determinazione quali- e quanti- tativa dei componenti di un determinato campione.



## CHIMICA ANALITICA «CLASSICA»

SAGGI CON REAGENTI CHIMICI  
SAGGI ALLA FIAMMA  
TITOLAZIONE  
METODI GRAVIMETRICI



## CHIMICA ANALITICA STRUMENTALE

SPETTROFOTOMETRIA  
SPETTROMETRIA DI MASSA  
ELETTROFORESI  
VOLTAMMETRIA  
**CROMATOGRAFIA**

Anche la Geochimica dei Fluidi si avvale di queste tecniche per la determinazione degli analiti in matrici liquide e gassose

**CROMATOGRAFIA per anioni e cationi nelle acque, ma non solo....**

# CROMATOGRAFIA

È una tecnica di separazione di vari componenti di una miscuglio

LA CROMATOGRAFIA O TECNICA CROMATOGRAFICA

CONSISTE NELLO SFRUTTARE IN MODO PARTICOLARMENTE EFFICIENTE

LA DIVERSA ATTITUDINE CHE OGNI SPECIE MOLECOLARE (COMPOSTO O

IONE) POSSIEDE NEL DISTRIBUIRSI TRA DUE DIFFERENTI FASI

(UNA STAZIONARIA E UNA MOBILE).

La fase stazionaria può essere costituita da:

- *un solido ...*
- *... o un liquido opportunamente supportato.*

La fase mobile è costituita da un fluido (che si muove sopra o attraverso la fase stazionaria), cioè da:

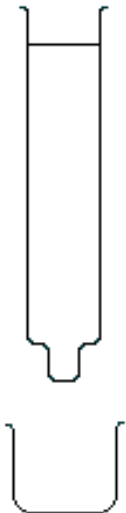
- *un liquido ...*
- *... o un gas.*

# NASCITA DELLA CROMATOGRAFIA

Si deve al botanico russo Mikhail Semenovich Tswett.

Egli intendeva separare i pigmenti presenti nella clorofilla; fece un estratto di foglie verdi in etere di petrolio (l'eluente), lo depositò in testa ad una colonna di vetro impaccata con carbonato di calcio (che ha il ruolo di adsorbente) ed *elui*, (cioè versò in continuo).

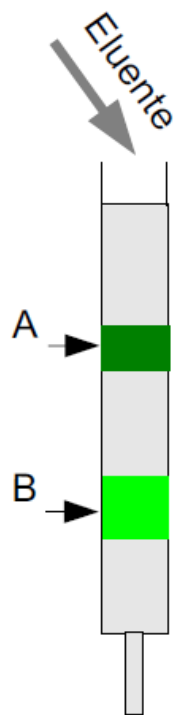
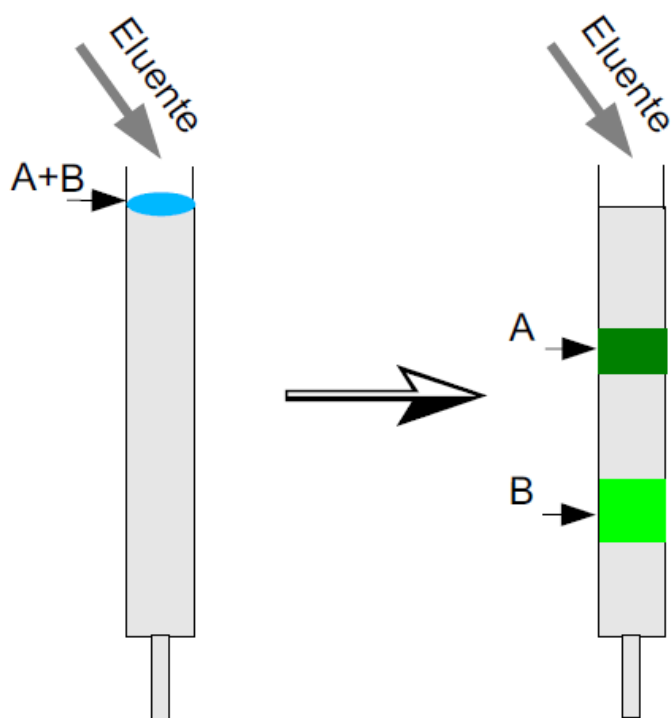
i vari pigmenti si separarono in bande colorate, in particolare clorofilla A e B, carotene e xantofilla.



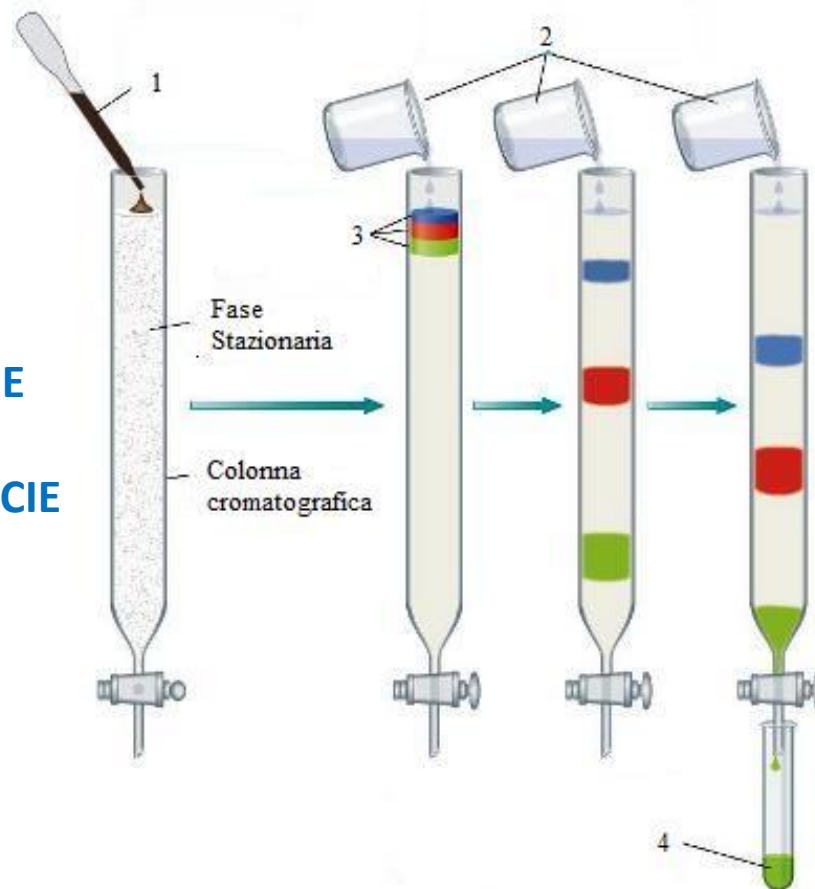
Tswett chiamò questa tecnica *cromatografia* dal greco : *chrômatos*, colore + *graphía*, scrivere, letteralmente *scrittura del colore*



Se una fase viene immobilizzata (fase stazionaria) e l'altra viene fatta scorrere attraverso essa (fase mobile, o '**ELUENTE**'), è possibile condurre un'estrazione in modo continuo.



**SOLUZIONI E  
MISCELE  
DA 2 A n SPECIE**



Una specie chimica immessa nella fase mobile (**ELUENTE**) che fluisce in una fase stazionaria si distribuirà infatti dinamicamente tra le due fasi in misura proporzionale alla diversa affinità che possiede per esse.

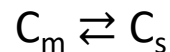
## *Il principio: la distribuzione delle sostanze tra due fasi*

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, scrivendo la formulazione della costante di equilibrio per questa reazione come:

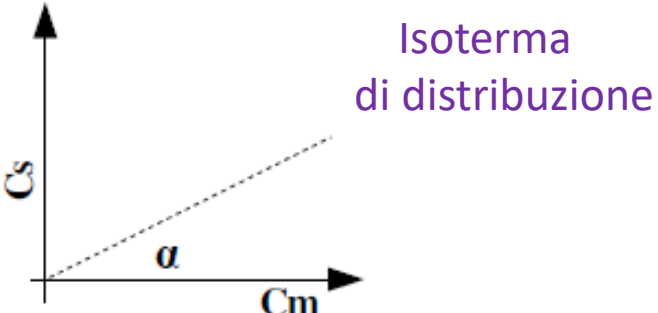
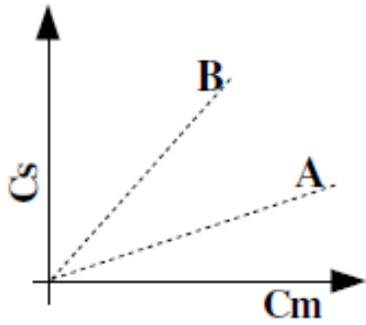
$$K = C_s / C_m$$

**Questa particolare forma di  $K_{eq}$  prende il nome di coefficiente di distribuzione/ripartizione ed è definito dalla legge di Nernst** che stabilisce che il rapporto tra le concentrazioni del soluto nelle due fasi a contatto fra loro.

Dal valore di K dipende il tempo necessario a percorrere l'intera fase stazionaria detto

## TEMPO DI RITENZIONE

Ovvero il tempo che una sostanza trascorre nella colonna dipende dal valore di  $C_s$  rispetto a  $C_m$ : un'elevata concentrazione nella fase stazionaria, rispetto a quella nella fase mobile indica una maggiore affinità per la prima.

Coefficiente di distribuzione e isoterme di distribuzione	
<p>L'equazione</p> $K = C_s / C_m$ <p>è l'equazione di una retta, la cui pendenza è data da</p> $\text{tg } \alpha = K.$	 <p>Isotherma di distribuzione</p>
<p>Nella figura 1 è riportata tale retta, detta <b>isoterma di distribuzione</b>, di due sostanze A e B per le quali <math>K_A &lt; K_B</math>.</p> <p>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.</p> <p><b>Quanto maggiore è la differenza di K tanto migliore sarà la separazione tra le sostanze.</b></p>	 <p>fig. 1</p>

**QUESTO PRINCIPIO CONSENTE LA SEPARAZIONE CROMATOGRAGICA**

## INTERAZIONE SOLUTO-FASI

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 oppure, al contrario, 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**

**N.B. NO LEGAMI COVALENTI**

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



# MECCANISMI SUI QUALI SI BASA LA SEPARAZIONE CROMATOGRAFICA

In base ai tipi di interazione prima descritti possiamo suddividere i meccanismi di separazione impiegati in cromatografia in:

- adsorbimento
- ripartizione
- scambio ionico
- esclusione
- affinità

La fase stazionaria interagisce con i componenti da separare in maniera diversa con l'effetto di diversificare la loro velocità e quindi il tempo di transito attraverso di essa.



differente tempo di ritenzione !!

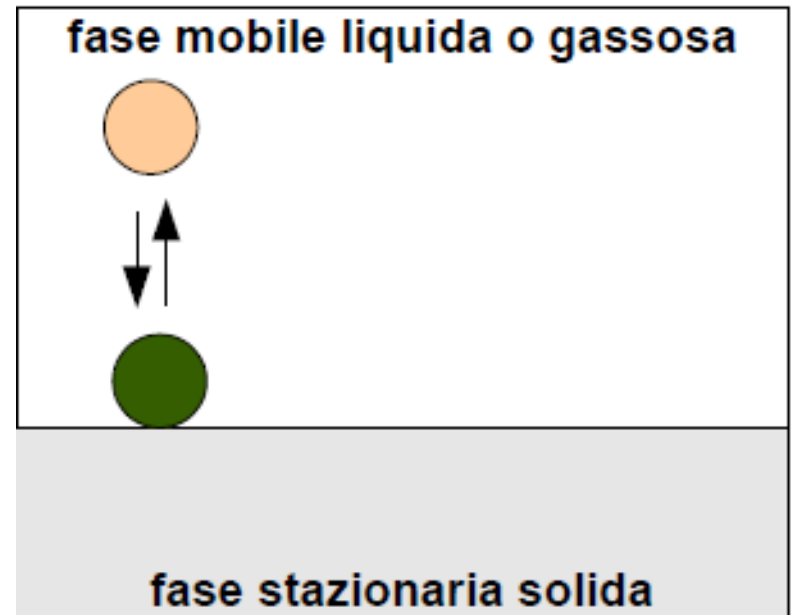
# Adsorbimento

La fase stazionaria è un solido sulla cui superficie si trovano dei siti attivi in grado di stabilire legami secondari (dipolo-dipolo, ponte di idrogeno, Van der Waals) con le diverse molecole della miscela da risolvere (separare).

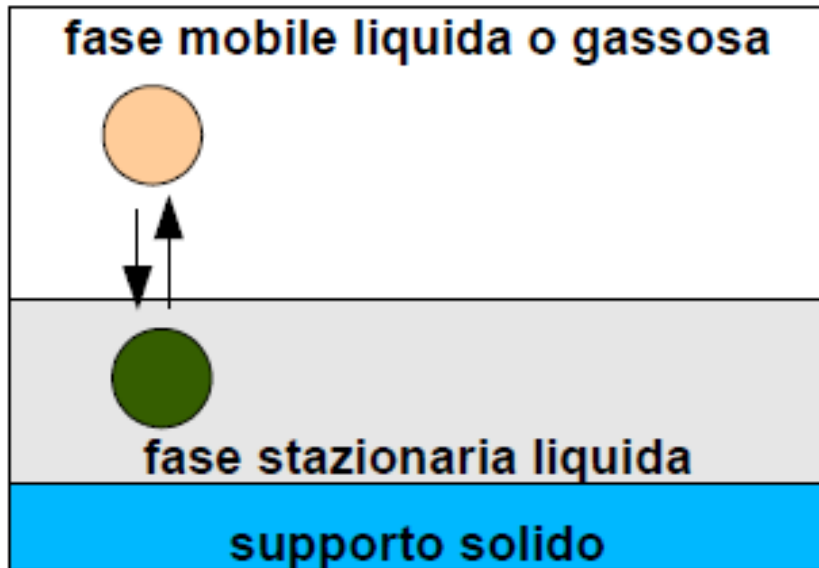
Se la fase mobile è un liquido si parla di cromatografia liquido-solido (**LSC**).

Se invece è un gas, di cromatografia gas-solido (**GSC**).

In genere, le molecole che più facilmente vengono fissate sono quelle che presentano gruppi polari, anche se la natura dell'adsorbente influisce sul fenomeno. L'aumento di temperatura agisce negativamente sull'adsorbimento in quanto provoca una maggior agitazione termica.



# Ripartizione



La fase stazionaria è un liquido inserito in un supporto solido, in cui si verifica una vera e propria solubilizzazione delle sostanze da analizzare. Esse pertanto si ripartiscono fra le due fasi (immiscibili tra loro).

Se la fase mobile è un gas si parla di cromatografia gas-liquido (**GLC**).

Se invece è un liquido, di cromatografia liquido-liquido (**LLC**).

La cromatografia di ripartizione è chiamata in fase normale se la fase stazionaria è più polare della fase mobile, mentre è chiamata fase inversa se la fase stazionaria è meno polare della fase mobile.

Gli analiti che hanno peggiore affinità saranno i primi ad abbandonare la colonna e quindi raggiungere il detector di misura. Man mano che procede l'analisi si può intervenire sulle condizioni per modificare la ripartizione.

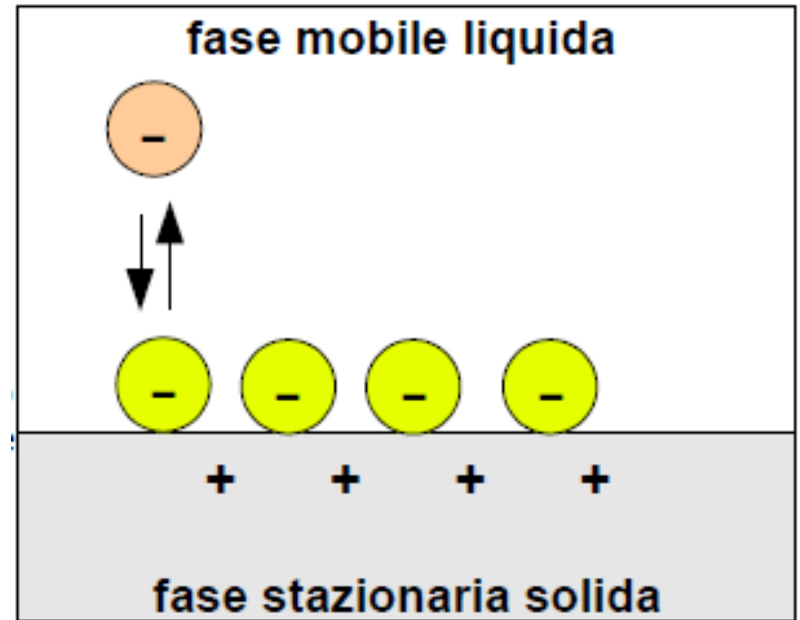
Si tratta della tecnica più comunemente impiegata per la separazione di sostanze organiche.

# Scambio ionico

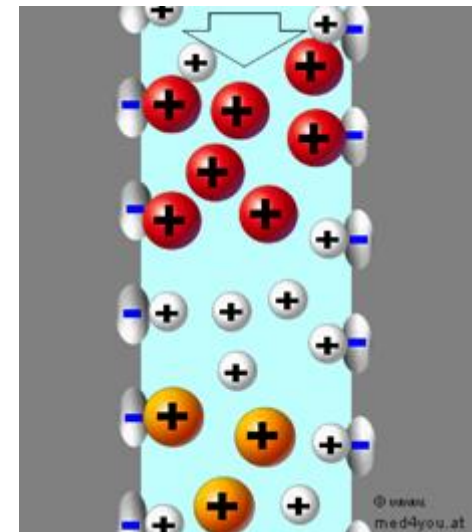
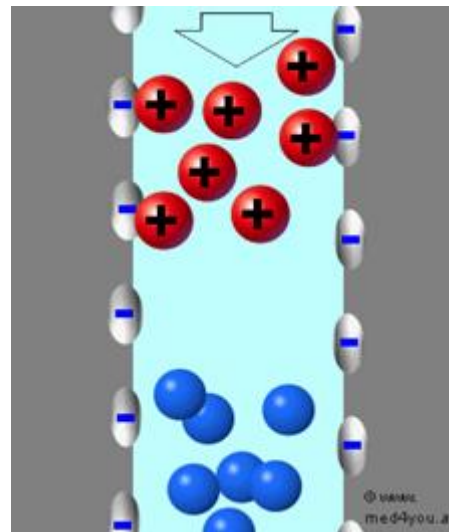
La fase stazionaria è costituita da un polimero inerte contenente siti attivi ionizzati o ionizzabili, i cui controioni possono essere scambiati con altri ioni aventi carica dello stesso segno.

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.

Si parla di *cromatografia di scambio ionico* (IEC) o più semplicemente IC (Ion Chromatography).



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

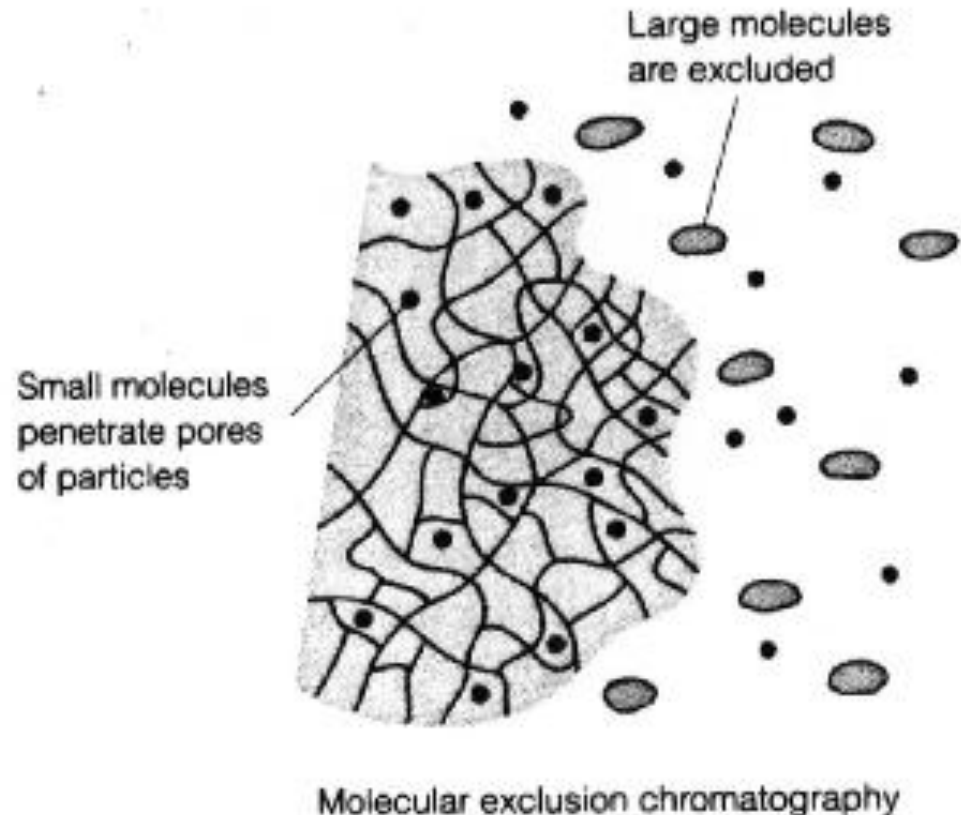


# Esclusione dimensionale

Si parla di *cromatografia di esclusione dimensionale* (SEC)

La fase stazionaria è un solido poroso o un gel.

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

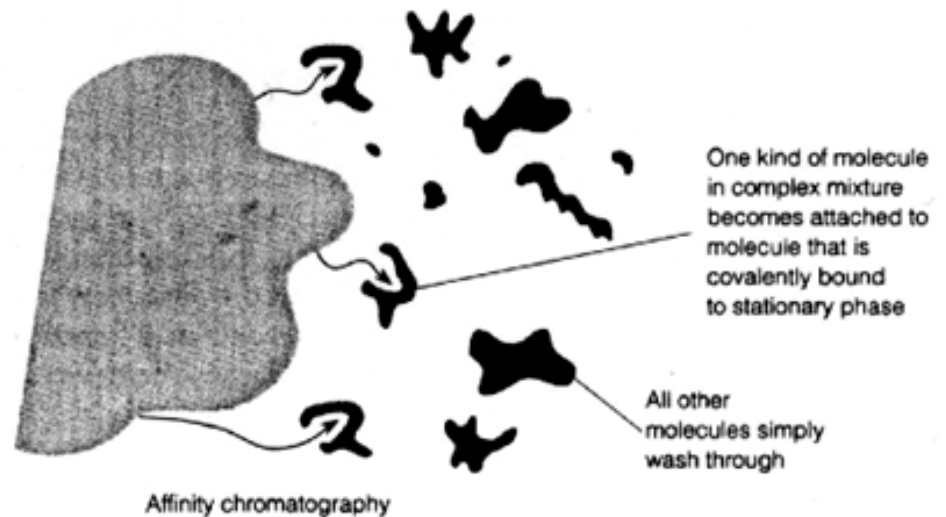


# Affinità

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* (AFC).

La cromatografia di affinità è impiegata nella separazione di molecole di interesse prevalentemente biochimico sfruttando il loro naturale selettivo: es, antigene-anticorpo, ormone-recettore, enzima-substrato.



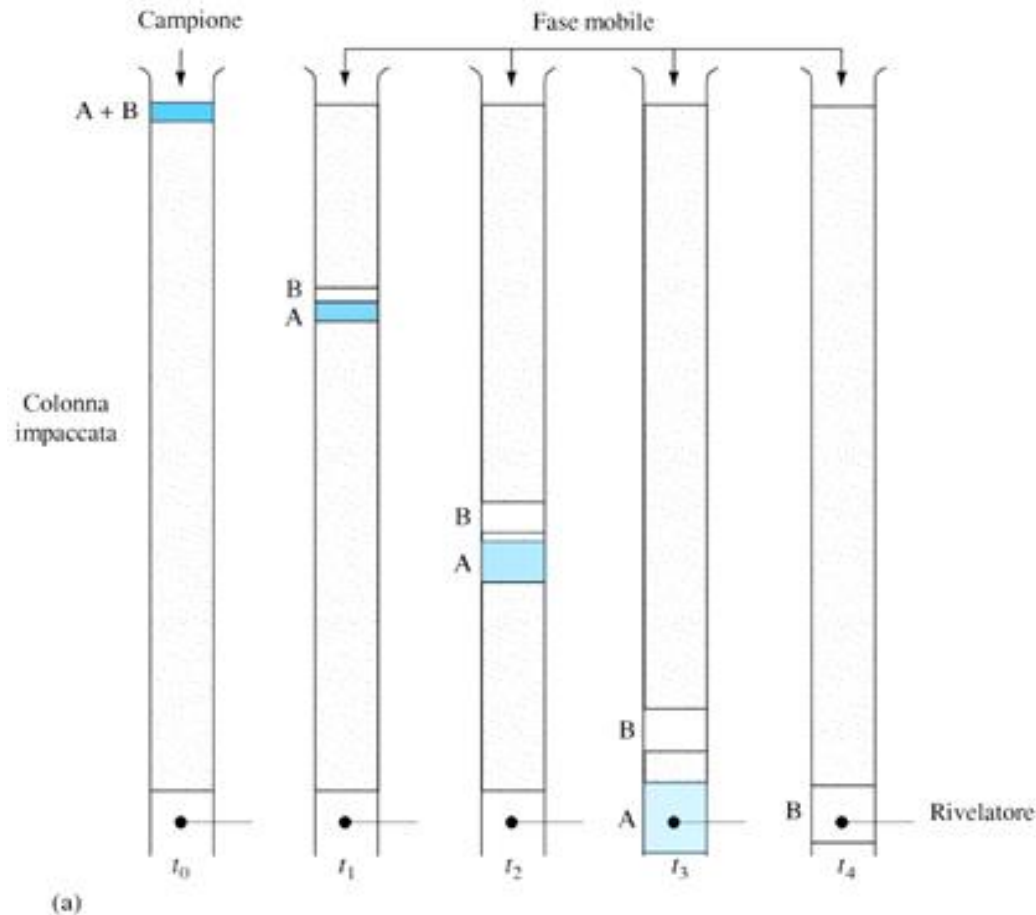
# VISUALIZZAZIONE DELLA SEPARAZIONE

Ponendo all'uscita della colonna un rivelatore che misuri la concentrazione del soluto nell'*eluato* (cioè la fase mobile che esce dalla colonna) e riportando il segnale in funzione del tempo si può ottenere un *cromatogramma*.

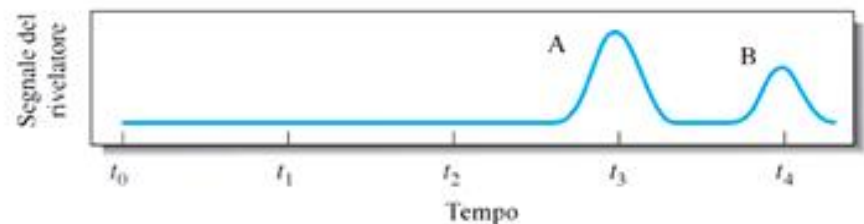
La posizione dei picchi sull'asse dei tempi, o *tempo di ritenzione*, serve per identificare i componenti del campione.

L'area sottesa dai picchi è proporzionale alla quantità di ogni singolo componente e può essere utilizzata a scopo quantitativo.

Utilizzo degli **STANDARD** noti.

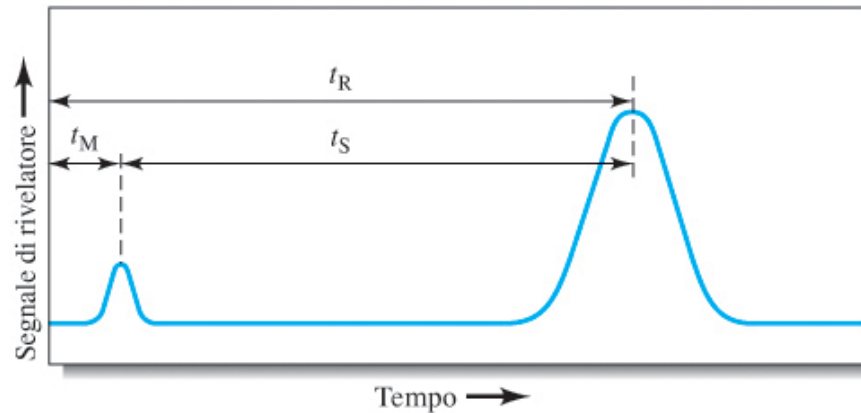


(a)



(b)

# TEMPO DI RITENZIONE



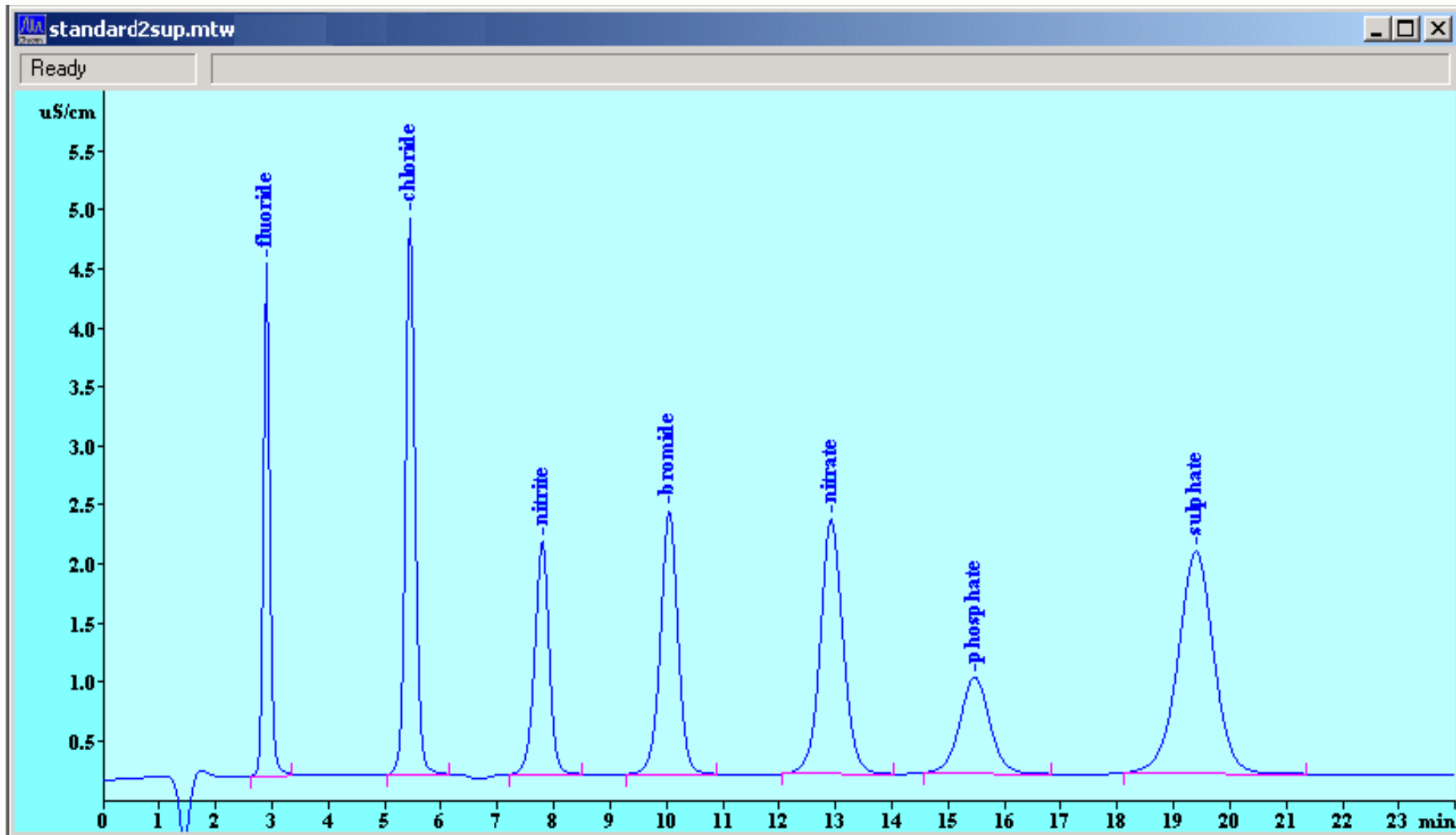
Il tempo di ritenzione  $t_R$  è il tempo che impiega un componente della miscela iniettata ad uscire dalla colonna o, tecnicamente, ad essere rivelato come picco dal detector.

Un tipico *cromatogramma* per una miscela a due componenti ha due situazioni diverse:

- il picco **a sinistra** rappresenta un soluto che non ha alcuna interazione con la fase stazionaria ed esce al cosiddetto tempo morto,  $t_M$
- il picco **a destra** rappresenta un soluto che ha, invece, interazione con la fase stazionaria ed esce al tempo  $t_R > t_M$



# ESEMPIO DI CROMATOGRAMMA IN IC



TEMPO (DI RITENZIONE)

CONDUCIBILITA'

# LE TECNICHE CROMATOGRAFICHE

La classificazione fondamentale dei metodi cromatografici si basa sul tipo di fase mobile

**Cromatografia Liquida (LC)**

**Gas Cromatografia (GC)**

**Cromatografia fluida supercritica (SFC)**

La cromatografia liquida puo essere realizzata su colonna, su strato sottile e su carta.

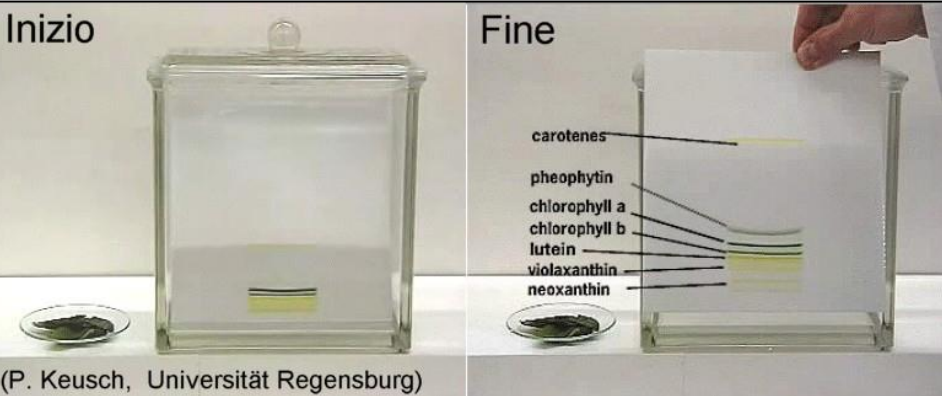
La gas-cromatografia è limitata all'uso della colonna.

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

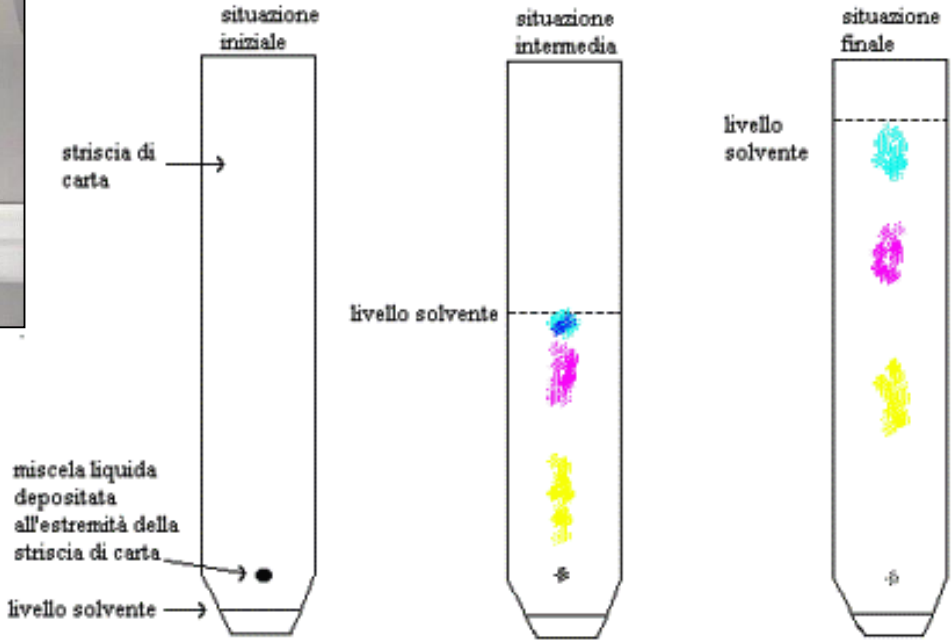
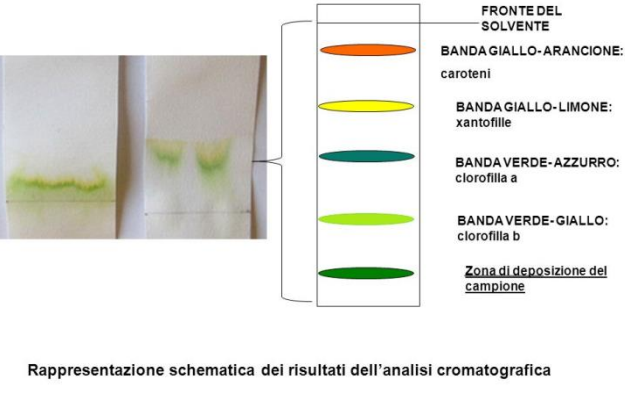
**Cromatografia su strato sottile (TLC)** , dove la fase stazionaria può essere gel di silice, allumina, cellulosa in polvere, fatta aderire ad un apposito supporto (alluminio, carta plastificata, lastra di vetro) e la fase mobile e costituita da vari solventi organici.

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

**Cromatografia su carta (PC)** , dove la fase stazionaria e 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 e scelta in funzione del tipo di fase stazionaria e delle proprietà chimiche dei composti da separare.



(P. Keusch, Università Regensburg)



## **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.



## **Cromatografia in fase liquida ad elevate prestazioni (HPLC).**

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.

# CROMATOGRAFO IONICO PER LA DETERMINAZIONE DEI COSTITUENTI IONICI MAGGIORI PRESENTI IN CAMPIONI DI ACQUA

COMPONENTI PRINCIPALI:

COLONNE

ELUENTE

RIVELATORE

SOPPRESSORE



# LE COLONNE

## Cuore dello strumento.

La separazione avviene per una serie di equilibri di scambio tra fase stazionaria e fase mobile (eluente).

Gli ioni con carica netta più elevata (al pH dell'eluente) vengono trattenuti più fortemente.

A parità di carica vi è un ordine di selettività che dipende dal tipo di fase stazionaria (dipende dalle costanti di scambio).

### **SONO COSTITUITE DA RESINE A SCAMBIO IONICO**

Le resine constano di un reticolo irregolare tridimensionale di catene di natura organica unite tra loro da legami spazialmente incrociati.

Su questa matrice sono fissati dei raggruppamenti ionici (quali  $-SO_3^-$ ,  $COO^-$ ,  $-NR_3^+$ ) in grado di interagire con uno ione metallico o per semplice scambio ionico o mediante formazione di legami di coordinazione (resine complessanti o chelanti).

# Come sono fatte le resine scambiatrici?

Sono costituite da gruppi carichi legati covalentemente ad una matrice di supporto

## MATRICI

- polimeri di stirene
- CM-cellulosa
- DEAE-cellulosa
- derivati del destrano (un polimero di glucosio) e dell'agarosio

## GRUPPI IONICI FUNZIONALI

- gruppo solfonato ( $R-SO_3^-$ )
- ammonio quaternario ( $R_4N^+$ )
- gruppo carbossilico ( $-COOH$ )
- dietilammonio  $(C_2H_5)_2NH_2$

Scambiatori forti

Scambiatori deboli

Lo scambiatore si dice **anionico** quando contiene dei gruppi carichi positivamente in grado cioè di legare degli ioni di carica negativa.



Lo scambiatore si dice **cationico** quando contiene delle cariche negative e i cationi sono attratti elettrostaticamente da questi siti di carica opposta.



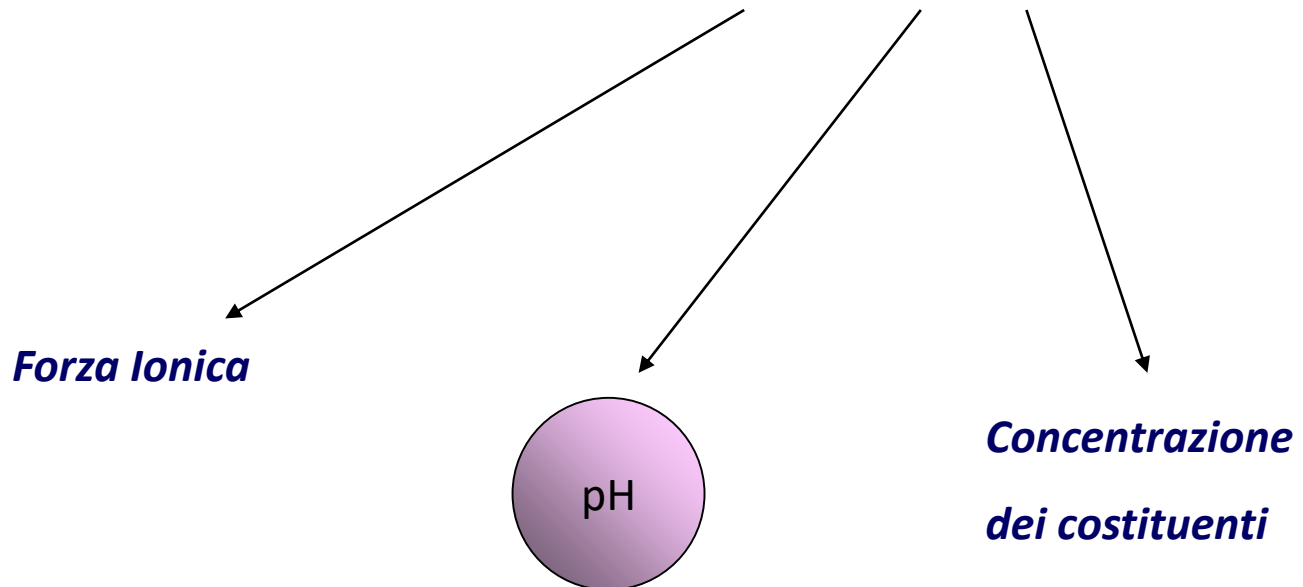


# ELUENTE

La fase eluente deve contenere elettroliti forti, composti ionici completamente dissociati, in grado di competere con gli analiti nello scambio con la resina. Gli analiti vengono eluiti più velocemente quanto più è alta la concentrazione di competitori.

Se rimane costante durante tutta l'analisi -> ***Eluizione Isocratica***

Se cambia di composizione durante l'analisi -> ***Gradiente di Eluizione***

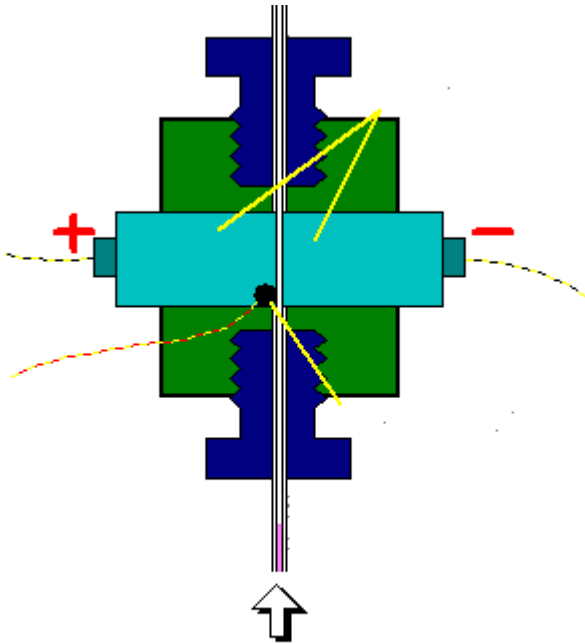


# RIVELATORE

Dato che si determinano ioni, il rivelatore universalmente utilizzato è costituito da una piccola cella conduttimetrica.

Applicando una piccola d.d.p tra i due elettrodi, fluisce una corrente proporzionale alla conducibilità dell'eluente + analita.

**Problema:** poiché i rivelatori a conducibilità rispondono a tutti gli ioni e l'eluente è costituito da una soluzione elettrolitica concentrata, il suo segnale coprirebbe quello degli analiti.



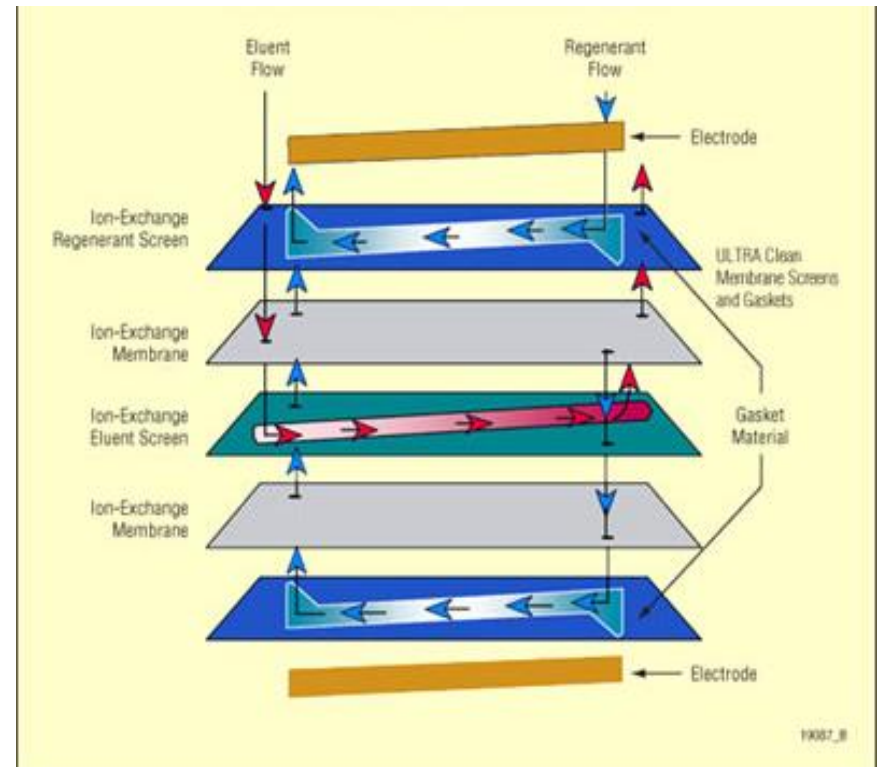
# SOPPRESSIONE

La conducibilità dell'eluente viene eliminata mediante un **SOPPRESSORE**

L'unità di soppressione può essere costituita da:

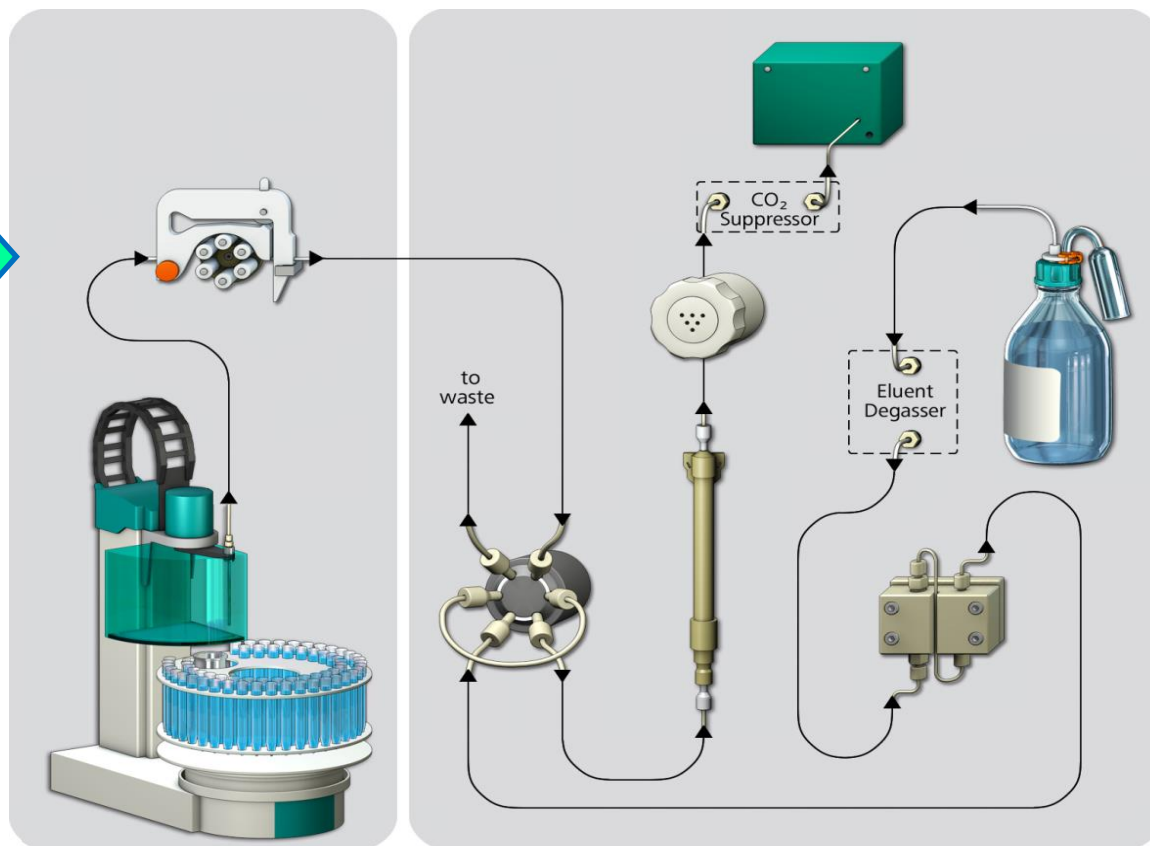
- Cartucce usa e getta;
- Micromembrana rigenerata controcorrente;
- Micromembrana rigenerata elettroliticamente.

Il soppressore è uno scambiatore di ioni di segno opposto rispetto agli analiti ed ha lo scopo di diminuire il segnale di fondo dato dagli ioni contenuti nell'eluente.



# CROMATOGRAFO IONICO PER LA DETERMINAZIONE DEI COSTITUENTI IONICI MAGGIORI

Campione →



Sample Changer



Peristaltic Pump



Injection Valve



Suppressor MSM



Detector



Eluent Degasser



Eluent



Column



CO<sub>2</sub> Suppressor MCS



High Pressure Pump

# Separazione di Anioni

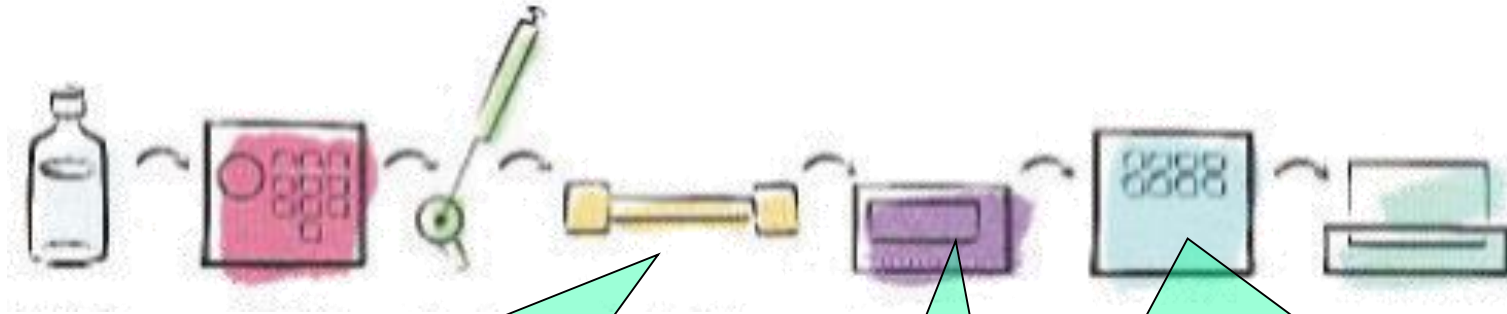
$F^-$ ,  $Cl^-$ ,  $Br^-$ ,  $NO_3^-$ ,  $SO_4^{2-}$  e  $PO_4^{3-}$

# Esempi

La configurazione dello strumento è:

- colonna con resine ammonio quaternario in forma  $HCO_3^-$
- soppressore in forma  $H^+$
- rivelatore conduttimetrico

Gli analiti in esame sono dissociati a qualsiasi pH quindi scegliamo come eluente una miscela  $Na_2CO_3/NaHCO_3$



Nella colonna gli anioni si separano ed escono a diversi tempi in forma  $Na^+$  ( $Na^+Cl^-$ ,...) insieme ad un largo eccesso di  $Na^+HCO_3^-$  e  $Na^+_2CO_3^{2-}$

Tutti gli analiti, trasformati in acidi forti, ( $H^+Cl^-$ ,...) danno un segnale mentre l'eluente, ora  $H_2CO_3$  poco dissociato, non viene rivelato

Nel soppressore il catione coordinato ( $Na^+$ ) viene sostituito da  $H^+$ .