

Laboratorio di Preparazioni Estrattive

La Cromatografia



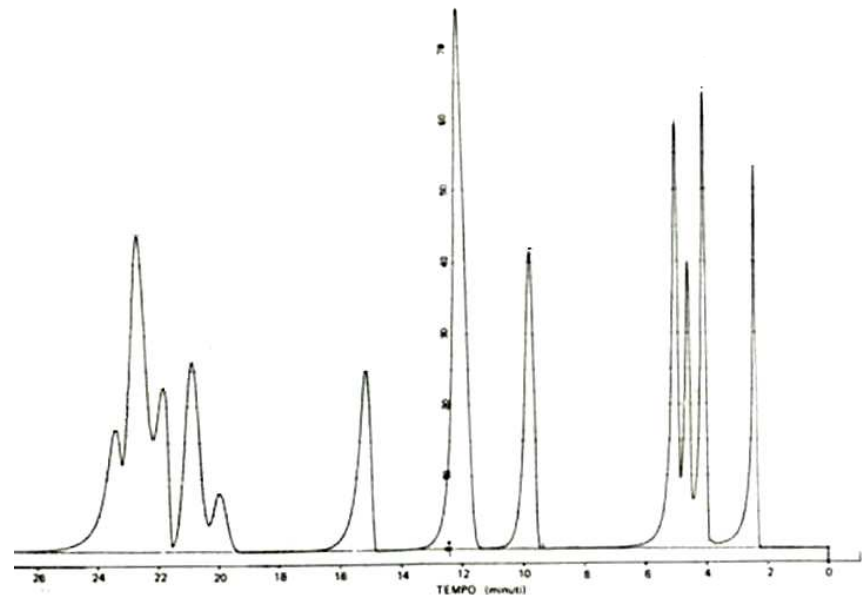
SAPIENZA
UNIVERSITÀ DI ROMA

I parametri del cromatogramma

Abbiamo visto che unendo i punti delle barre che rappresentano le concentrazioni nelle porzioni consecutive della fase mobile si ottiene una gaussiana.

Poiché nella maggior parte dei sistemi cromatografici destinati a misure quantitative vi è un sistema di misura che rileva la concentrazione della sostanza, esso restituirà tale informazione proprio sotto forma di tale curva.

I segnali si presentano spesso asimmetrici o parzialmente sovrapposti ma tali picchi hanno dei parametri caratteristici che derivano appunto dalla loro natura gaussiana.



Altezza del picco	h
Ampiezza a metà altezza	$w_{h1/2}$
Larghezza della base	w_b
Distanza tra i punti di flesso	w_i

tra loro esistono le relazioni

$$w_i = w_b/2 = 2 \sigma$$

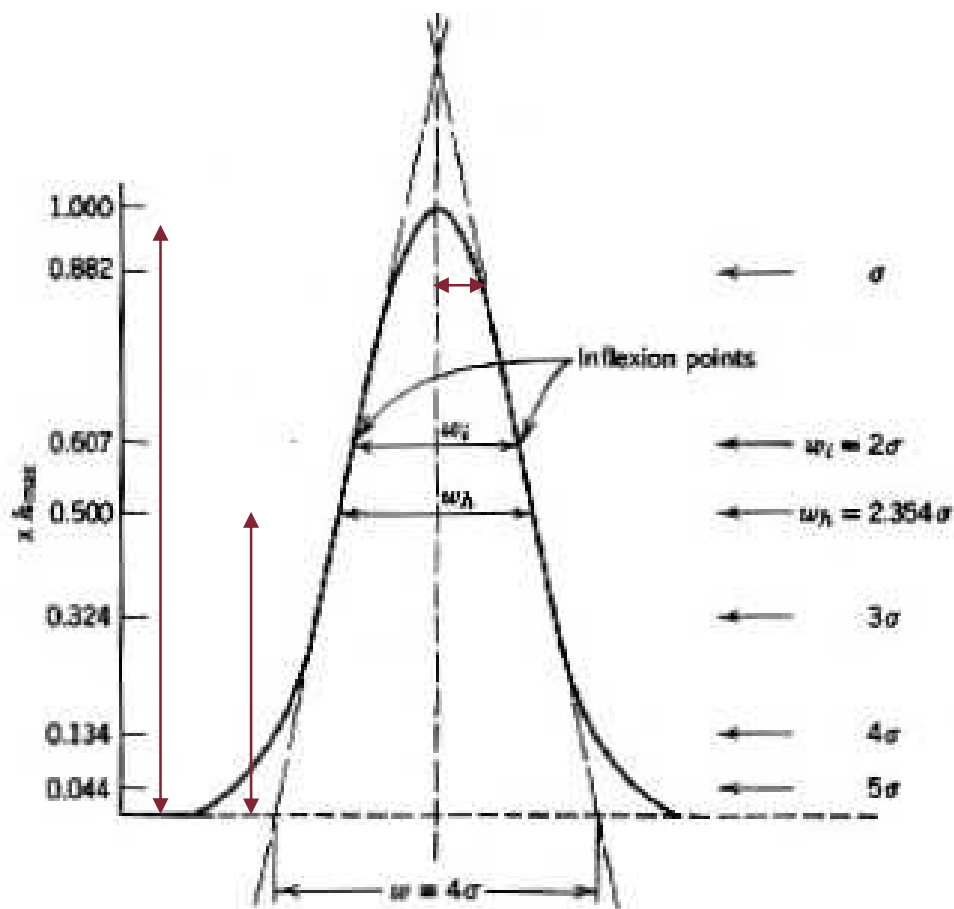
$$w_b = 1,699 w_{h1/2}$$

$$w_h = 1,177 w_i$$

Queste relazioni nascono dal fatto che tutti i picchi sono delle gaussiane con equazione

$$y = h e^{-1/2(x/\sigma)^2}$$

y = ordinata distante x dall'asse di simmetria del picco
 h = altezza (per $x=0$)
 σ = deviazione standard (all'ordinata 0.882 h)



Altri parametri importanti sono

t_R tempo di ritenzione

$t_{R'}$ tempo di ritenzione corretto

t_M tempo morto

per evidenziare la relazione tra il tempo che una sostanza impiega per passare e impiega per mettersi in equilibrio con la fase stazionaria

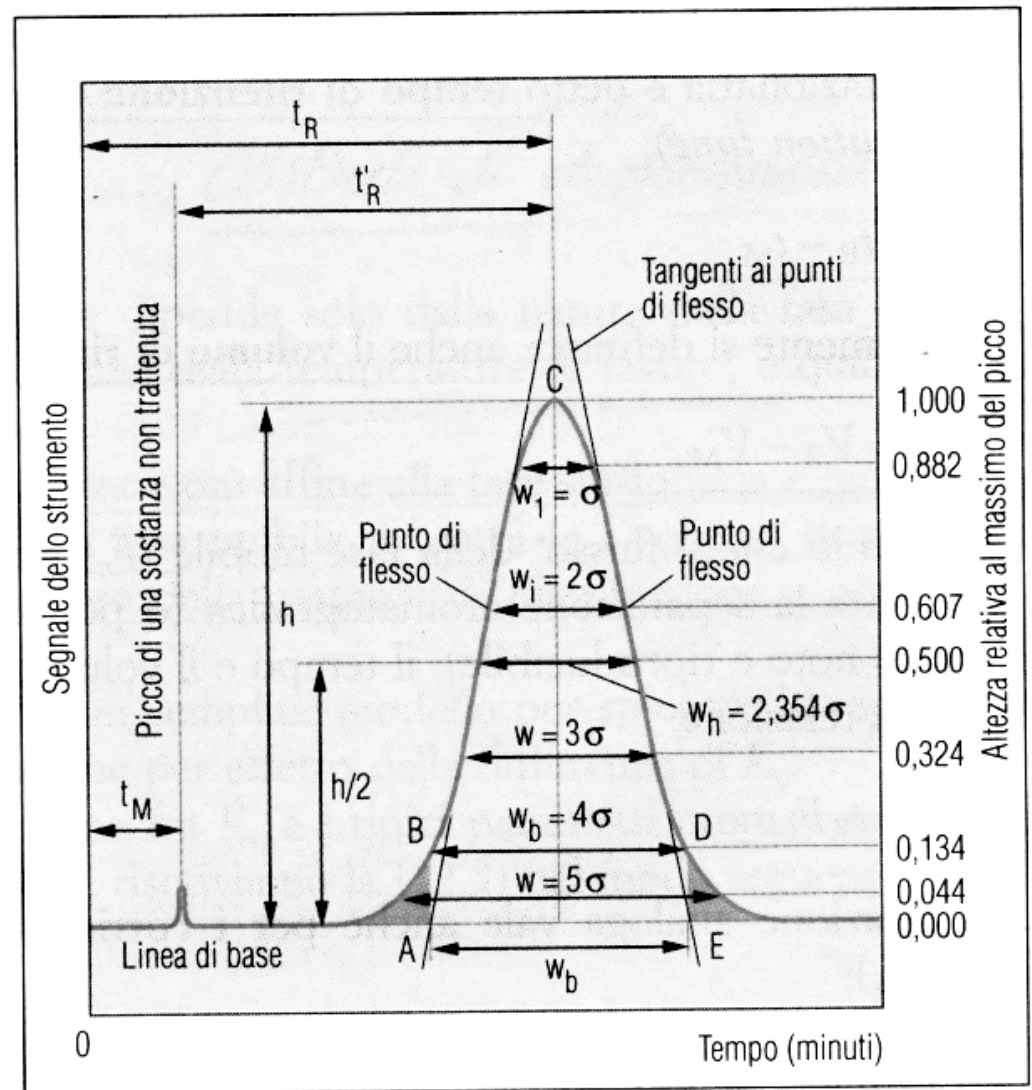
$$t_{R'} = t_R - t_M$$

e il volume di ritenzione corretto

$$V_{R'} = t_{R'} \cdot F_C$$

Area del picco

$$A = \sqrt{2\pi} \cdot h \cdot \sigma = 2,51 \cdot h \cdot \sigma$$



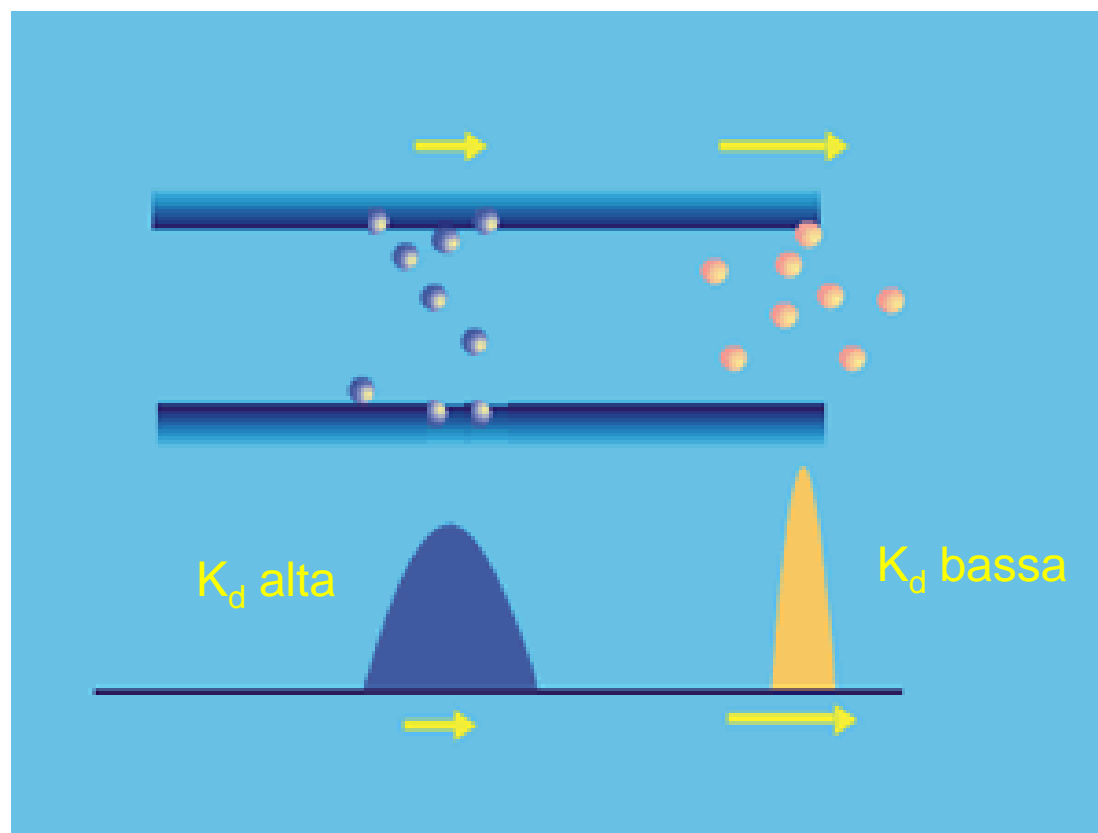
Grandezze ed equazioni fondamentali

Come per la ripartizione, così anche per qualsiasi altro meccanismo si può definire una costante che rappresenti il rapporto tra le concentrazioni di una sostanza nella fase stazionaria (C_s) e nella fase mobile (C_M). La chiameremo costante di distribuzione e dipenderà, oltre che dalla temperatura, dalla coppia di fasi usate:

$$K_d = C_s / C_M$$

Vista come è costruita, tanto maggiore è la K_d di una sostanza relativa a una coppia di fasi e

- tanto più sarà trattenuta dalla fase stazionaria
- tanto più sarà elevato il suo tempo di ritenzione

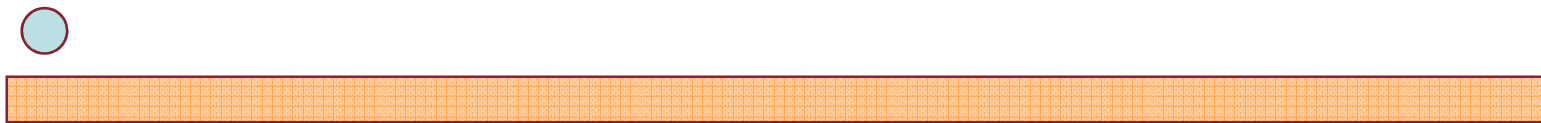


Per una data sostanza si ha

t_R = tempo di ritenzione, cioè il tempo che una sostanza deve usare per scorrere attraverso una colonna facendo le interazioni



t_M = tempo morto, cioè il tempo che una sostanza che non faccia alcuna interazione utilizza comunque per passare



Tenendo conto del flusso (F) della fase mobile, si possono considerarne anche i volumi usati. Analogamente si avrà

il volume di ritenzione $V_R = F t_R$

il volume morto $V_M = F t_M$

La relazione tra la costante e i parametri del picco è espressa dall'equazione fondamentale della cromatografia

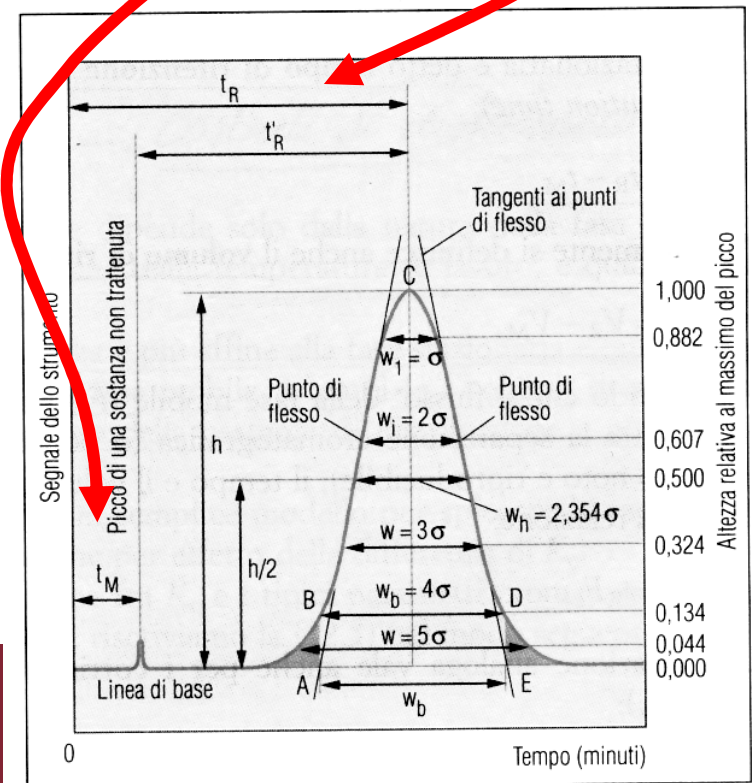
$$V_R = V_M + K_d \cdot V_S \quad \text{dove}$$

V_R = volume di ritenzione di una data sostanza

V_M = volume morto (o volume della fase mobile)

V_S = volume della fase stazionaria

- Quest'ultima variabile, a differenza di V_R e V_M , non è misurabile facilmente per cui rende difficile il calcolo di K_d a partire dal cromatogramma



Si preferisce allora, invece di K_d , far riferimento al *fattore di ritenzione*, espresso come le *moli* distribuite tra le due fasi

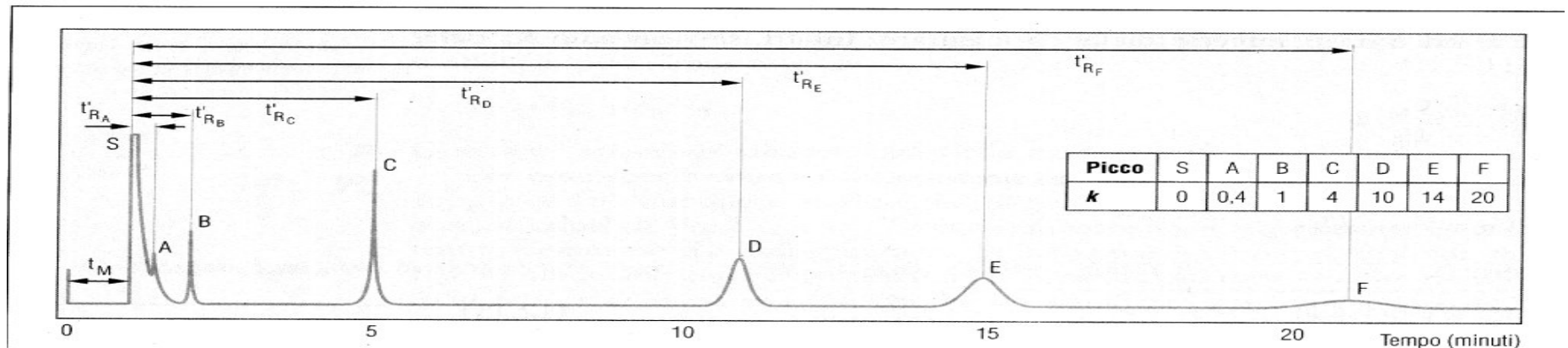
$$k = n_s/n_M$$

Si può dimostrare che questo parametro è determinabile da valori del cromatogramma secondo la relazione

$$k = t'_R / t_M$$

Anch'esso dipende dalla temperatura e dalla coppia delle fasi in uso ma anche dalle caratteristiche dell'impaccamento, dalla granulometria e dallo spessore della fase stazionaria.

Buone separazioni si hanno se la prima sostanza eluita ha k superiore a 1. Quelle successive devono comunque avere k non superiori a 10-15 onde evitare tempi lunghi per le analisi ed eccessiva dispersione (i picchi si appiattiscono troppo)



La **selettività** indica la capacità di un sistema cromatografico di eluire specie chimiche diverse con velocità tali che escano separate dalla colonna.

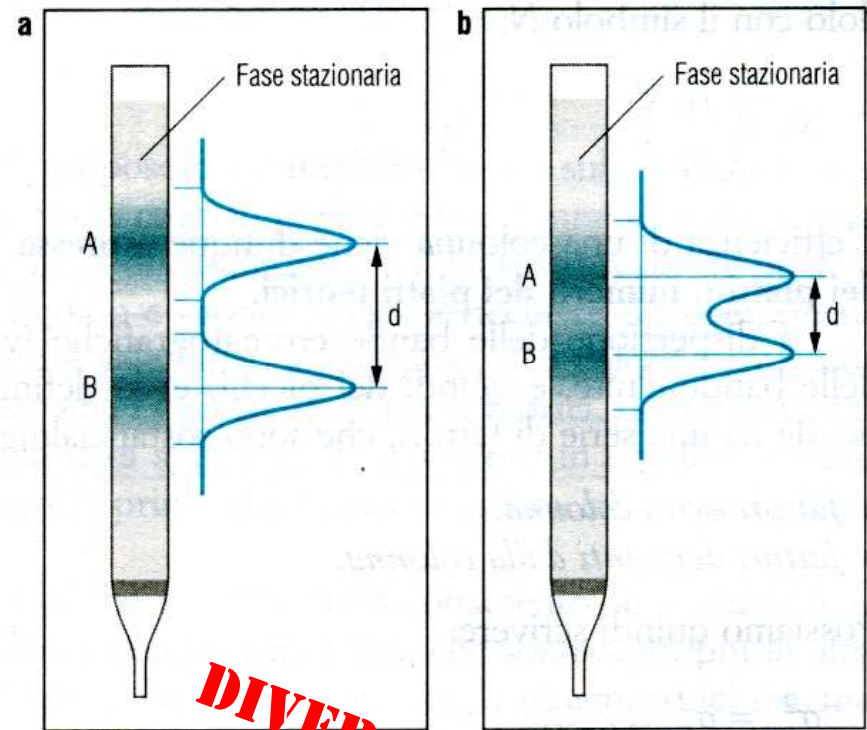
- La selettività verso due sostanze di un sistema cromatografico viene espressa dal cosiddetto **fattore di separazione**

$$\alpha = t'_{R2} / t'_{R1}$$

espresso anche come

$$\alpha = k_2 / k_1 = K_{d2} / K_{d1}$$

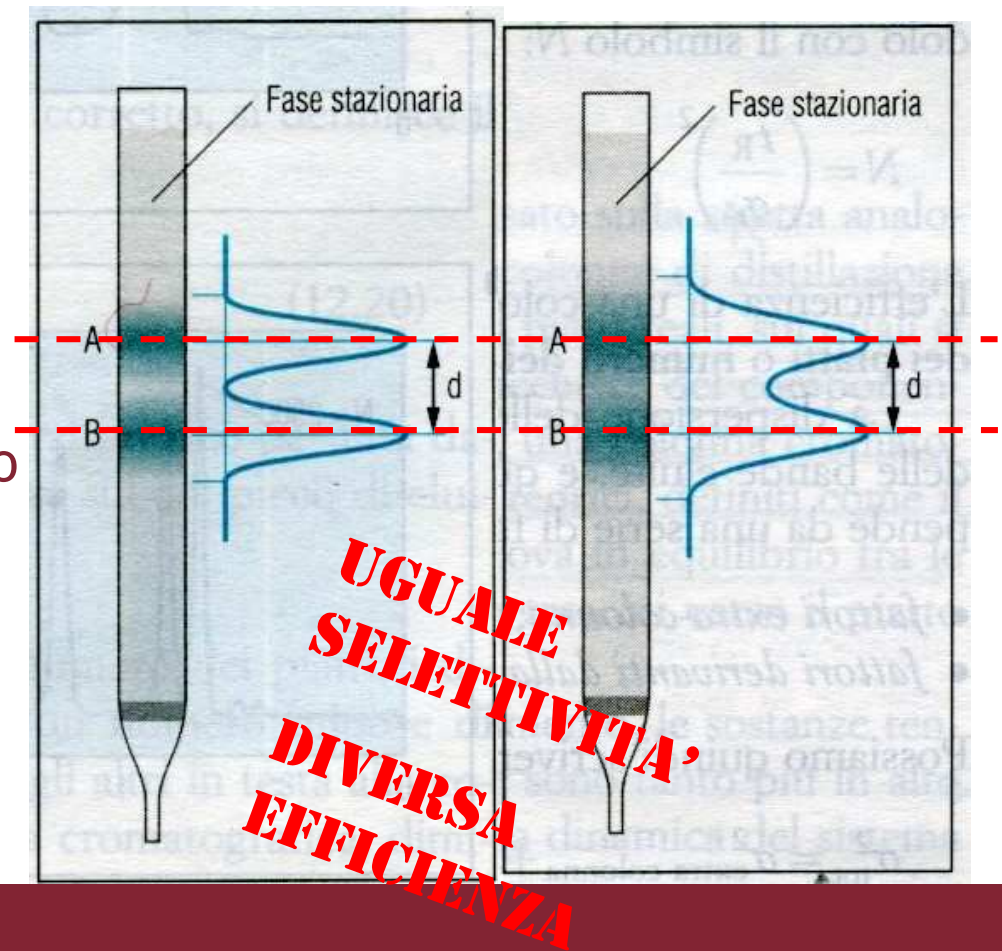
- La selettività dipende dal meccanismo della separazione cromatografica ma non dalle caratteristiche costruttive e deve essere maggiore di 1,2.



**DIVERSA
SELETTIVITA'**

La qualità di una separazione cromatografica non dipende solo da α ma anche dalla capacità di un sistema di eluire tutte le particelle di una data specie chimica con la stessa velocità. La capacità di formare picchi molto stretti è l' **efficienza**

- Il parametro più semplice con cui esprimere l'efficienza è la larghezza alla base del picco (w_b), che in genere è diversa per ogni specie chimica in un dato sistema cromatografico.
- L'efficienza di una colonna verso una data sostanza viene espressa anche con **N**, detto **numero dei piatti teorici**.



Il **numero dei piatti teorici** di una colonna cromatografica è ricavabile da

$$N = 16 (t_R/w_b)^2$$

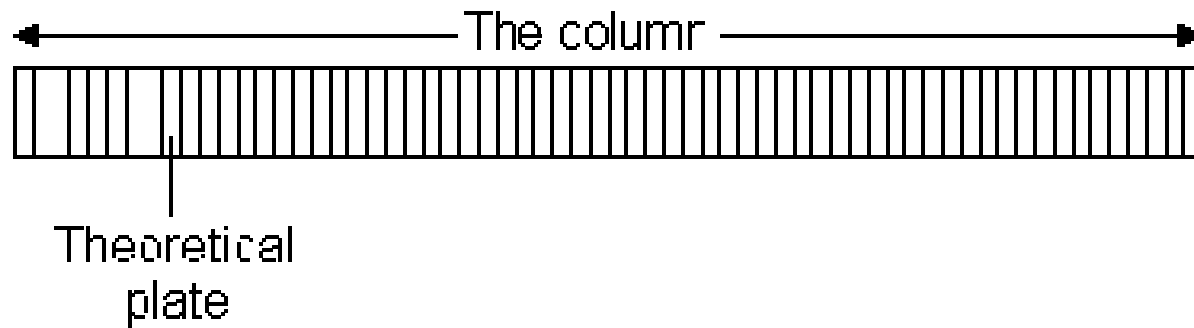
mentre facendo riferimento al tempo di ritenzione corretto, si definisce il numero dei **piatti effettivi**

$$N_{\text{eff}} = 16 (t'_R/w_b)^2$$

E' importante precisare che N *non* è un parametro caratteristico per una data colonna, poiché dipende anche dalla sostanza eluita.

Ciò significa che una stessa colonna attraversata da due sostanze mostra due diversi valori di piatti teorici.

Il concetto di piatto teorico è stato preso a prestito dalla teoria della colonna di distillazione. Si può immaginare che una colonna cromatografica, come una di distillazione, sia suddivisa appunto in tante zone in cui si instaura l'equilibrio di ripartizione dell'analita tra fase stazionaria e fase mobile (vedi CROMATOGRAFIA 1).

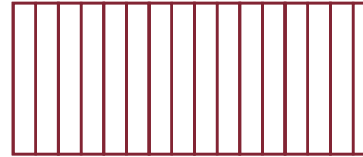


La sostanza si sposta verso la fine della colonna attraverso la fase mobile che, in equilibrio su un piatto, si passa al piatto successivo.

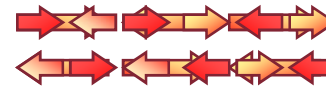
È importante sottolineare che, a differenza della colonna di distillazione, i piatti *non esistono realmente* all'interno della colonna ma sono solo un modello per facilitare la comprensione del processo che avviene.

Se si aumenta N , diminuisce il numero dei piatti teorici su cui si distribuisce ogni sostanza poiché aumentano gli equilibri a cui essa è sottoposta; a parità di lunghezza, pertanto, si accorcia il tratto di colonna su cui si distribuisce ogni sostanza.

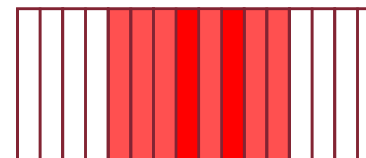
Aumentando i piatti



**aumentano
gli equilibri**



**più compatta viaggia
la sostanza**



L'efficienza di una colonna aumenta con il numero dei piatti: tanto maggiore è N, tanto più compatta è la banda in uscita e quindi tanto più è stretto il picco sul cromatogramma.



- Il modo più semplice per aumentare il numero dei piatti consiste nell'aumentare la lunghezza della colonna ma ciò comporta un *notevole aumento* dei tempi di ritenzione.
- In alternativa si deve trovare un modo di diminuire le dimensioni di un singolo piatto. A parità di lunghezza una colonna sarà più efficiente quando viene minimizzata l'**altezza equivalente al piatto teorico**

$$H = L/N$$

dove L è la lunghezza della colonna. Ancora più adatta è la formula

$$H_{\text{eff}} = L/N_{\text{eff}}$$

Una colonna è tanto più efficiente (nei confronti di una determinata specie chimica), e fornisce quindi picchi tanto più stretti, quanto minore è il valore di H.

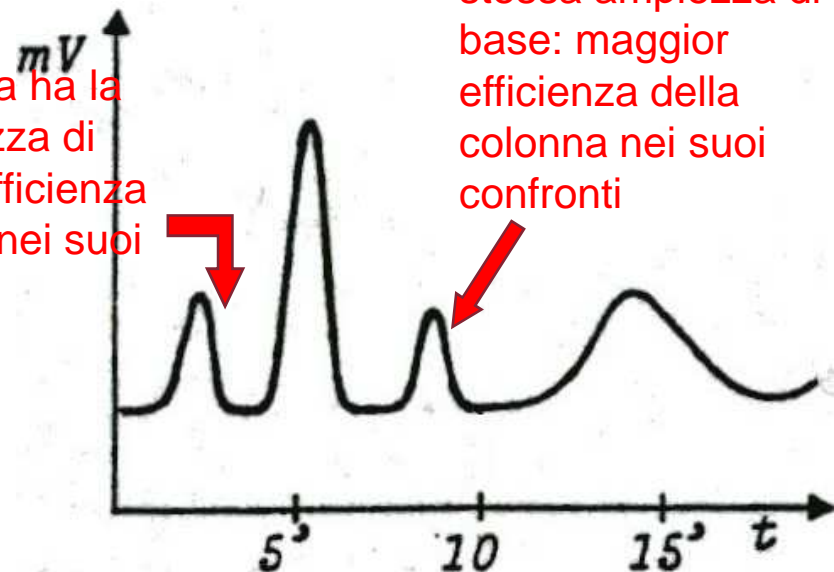
Il parametro H è indipendente dalla lunghezza della colonna e quindi è più adatto di N per confrontare le prestazioni di colonne diverse verso una stessa sostanza.

Il numero di piatti teorici, e quindi la loro altezza, può essere calcolato esaminando un picco cromatografico dopo l'eluizione.

$$N_{\text{eff}} = 16 (t'_R/w_b)^2$$

- Come si può osservare dall'equazione, il numero di piatti della colonna è diverso per ciascun componente del campione.

Esce prima ma ha la stessa ampiezza di base: minor efficienza della colonna nei suoi confronti



Esce dopo ma ha la stessa ampiezza di base: maggior efficienza della colonna nei suoi confronti

A typical Van Deemter plot

