

Laboratorio di Preparazioni Estrattive

La Cromatografia

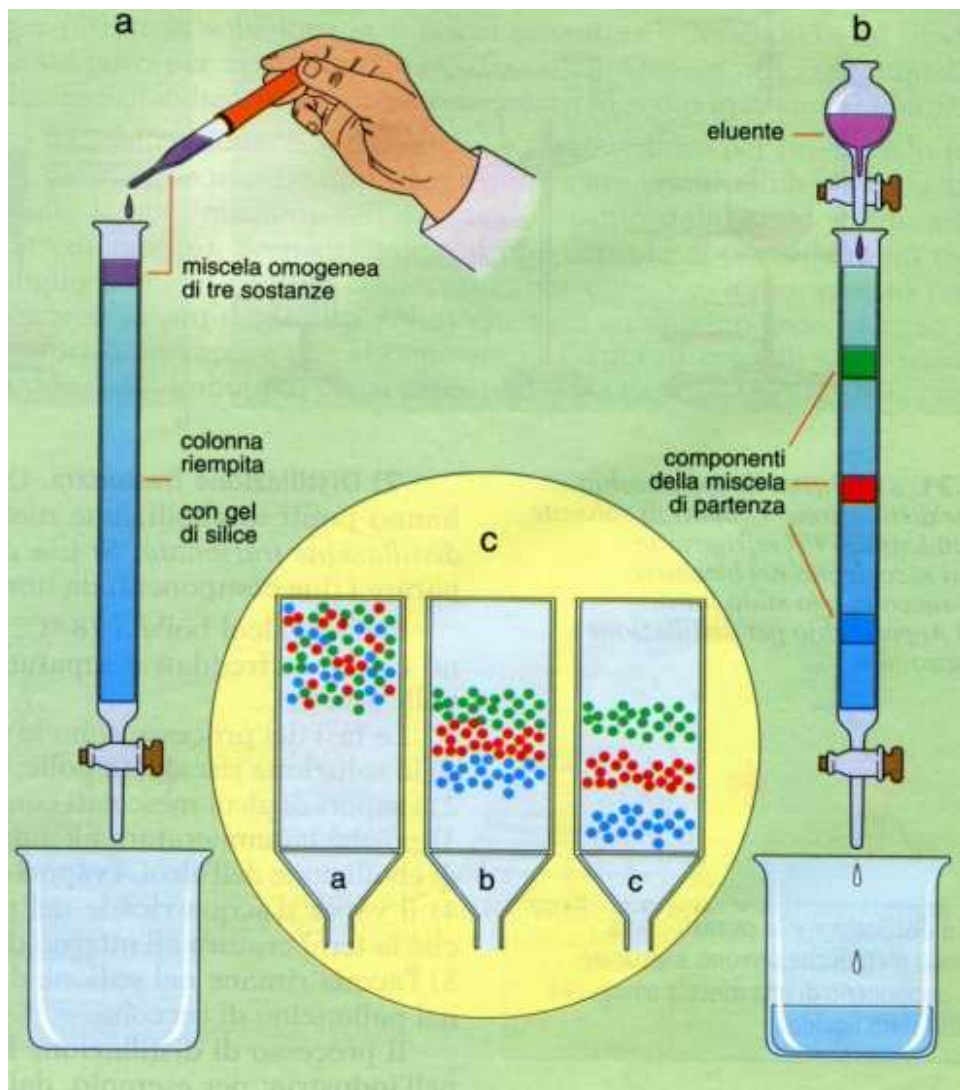


SAPIENZA
UNIVERSITÀ DI ROMA

La cromatografia

La cromatografia è un insieme di metodi che, sfruttando fenomeni chimico-fisici, consentono di separare e identificare i diversi componenti di un miscuglio.

La tecnica cromatografica nacque dall'esigenza di separare i singoli costituenti di miscele anche molto complesse. Pertanto, i metodi così detti cromatografici si sono rivelati tra i più efficienti e versatili, tanto che il loro campo d'applicazione si estende a tutti i rami delle scienze naturali e della chimica.



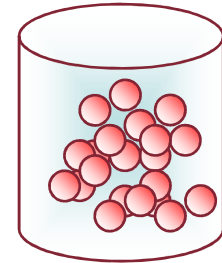
Il termine cromatografia, è dovuto al fatto che le prime separazioni venivano effettuate su composti colorati (alcuni coloranti naturali tra cui la clorofilla), e che le sostanze, una volta separate, venivano identificate attraverso il loro colore.

In alcune semplici tecniche cromatografiche, i metodi di rilevazione sono ancora basati sull'esame del colore delle sostanze separate o, per le sostanze incolori, sulla formazione di sostanze colorate, mediante l'impiego di opportuni reattivi chimici.

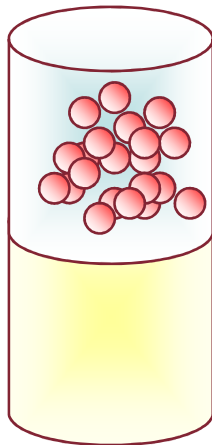
Fra i primi ricercatori che si dedicarono a questo tipo di analisi occupa un posto di assoluta preminenza **Tsweet**, botanico russo, che formulò l'interpretazione corretta del fenomeno ed ebbe la chiara intuizione dei suoi sviluppi futuri.

Il meccanismo di base

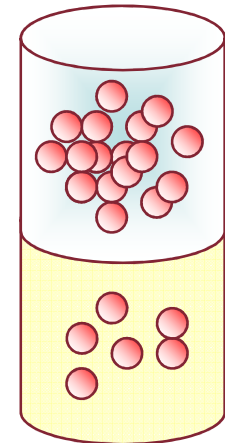
Supponiamo di avere una singola sostanza sciolta in una data quantità di un determinato solvente.

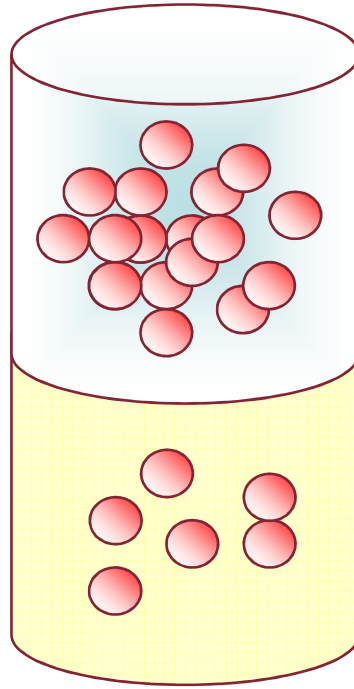


Se a questa soluzione viene affacciato un uguale volume di un altro solvente, immiscibile nel primo,...



...la sostanza si distribuirà tra i due solventi arrivando a concentrazioni che dipendono dalle caratteristiche dei solventi e della sostanza.





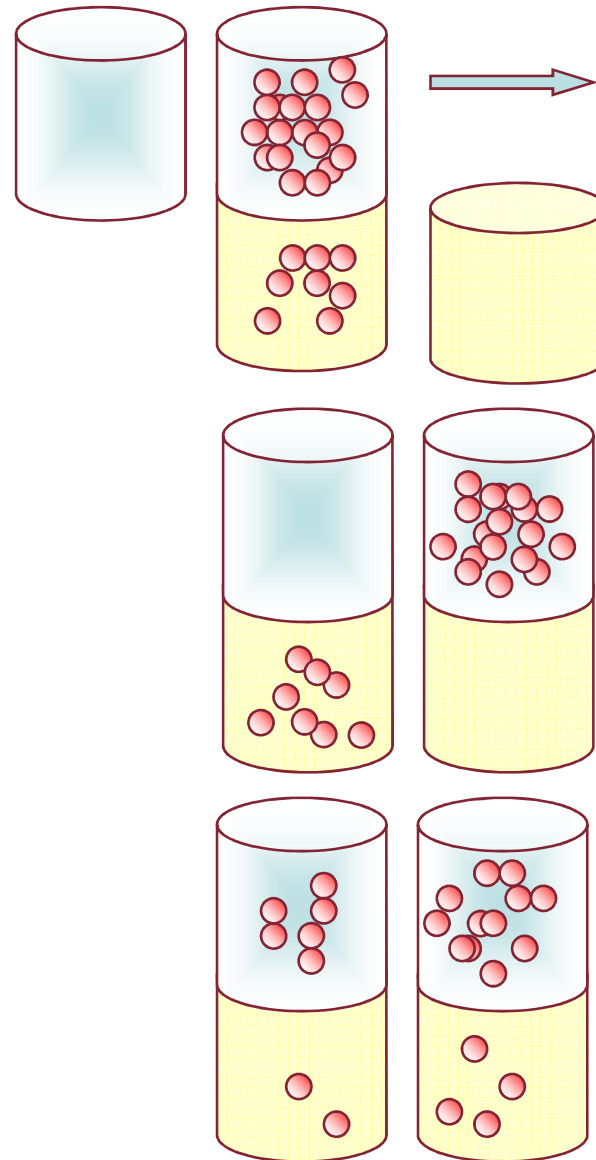
Le concentrazioni di equilibrio rimangono costanti, pur essendo le molecole in continuo passaggio da una fase all'altra. Si tratta di un equilibrio dinamico caratterizzato dalla relazione

$$K_{\text{rip}} = [A]_{\text{mob}} / [A]_{\text{sta}}$$

Se ora entrambe le porzioni sono affacciate a nuovi volumi di solvente differente...

...tenendo cioè fissa la posizione della porzione sottostante (*fase stazionaria*), e spostando quella superiore (*fase mobile*)...

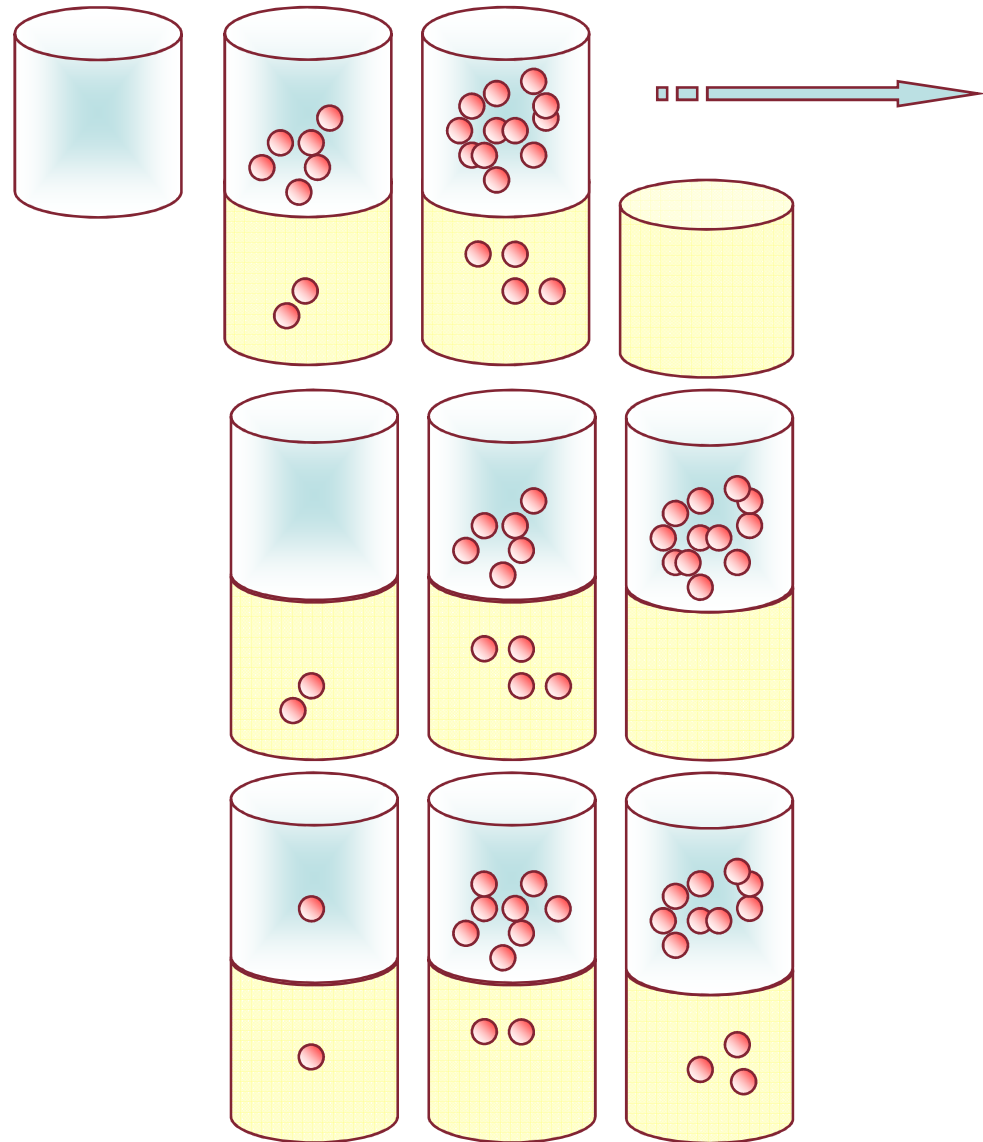
...in ciascuna coppia ottenuta la sostanza si distribuirà secondo lo stesso rapporto che era stato rispettato nella prima equilibrizzazione.



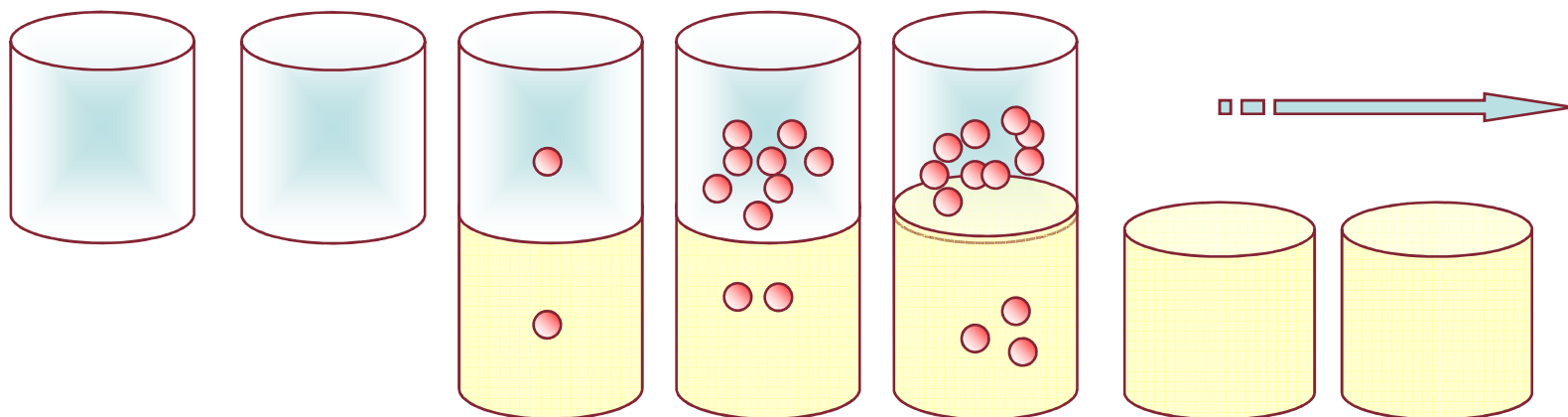
Ripetendo ora il processo di affacciamento con volumi puliti degli stessi solventi...

...mantenendo sempre fissa la fase stazionaria e spostando la fase mobile...

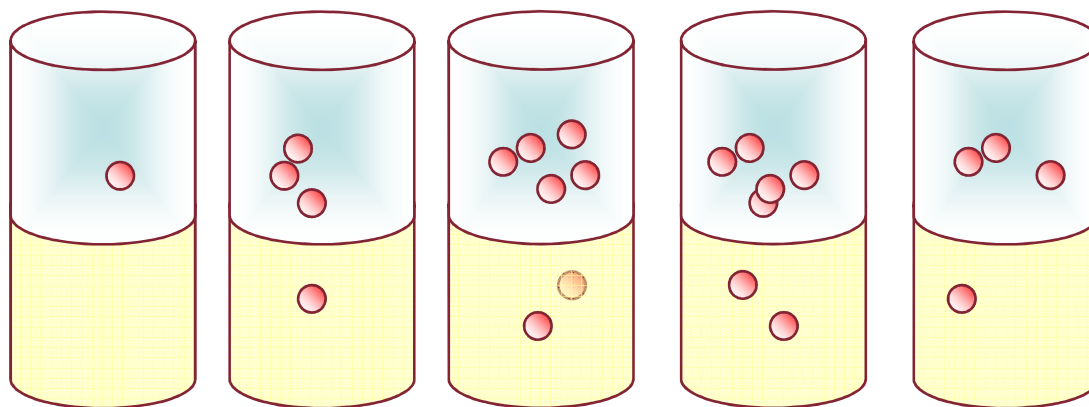
...in ciascuna coppia ottenuta la sostanza si distribuirà secondo lo stesso rapporto già osservato nella prima equilibratura

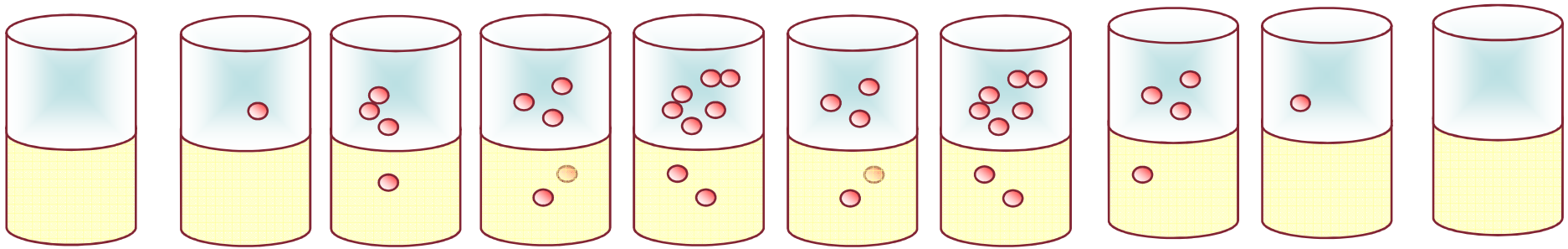


Ripetendo ora più e più volte il processo di affacciamento con volumi freschi di fase stazionaria e fase mobile



...in ciascuna coppia ottenuta la sostanza si distribuirà secondo il solito rapporto.





Dopo molti affiancamenti/equilibrazioni, le distribuzioni che si instaurano mostrano che la sostanza:

- si sposta seguendo la direzione della fase mobile
- si accumula preferenzialmente nelle porzioni centrali

Le concentrazioni che si realizzano in ciascuna porzione dipendono ovviamente da quale è la “preferenza” che la sostanza mostra per le due fasi.

Nelle pagine successive sono indicate le distribuzioni percentuali nelle porzioni di fasi mobili dopo 5, 10, e 25 spostamenti e relative equilibrazioni per quattro diverse sostanze che presentano rapporti di distribuzione pari a

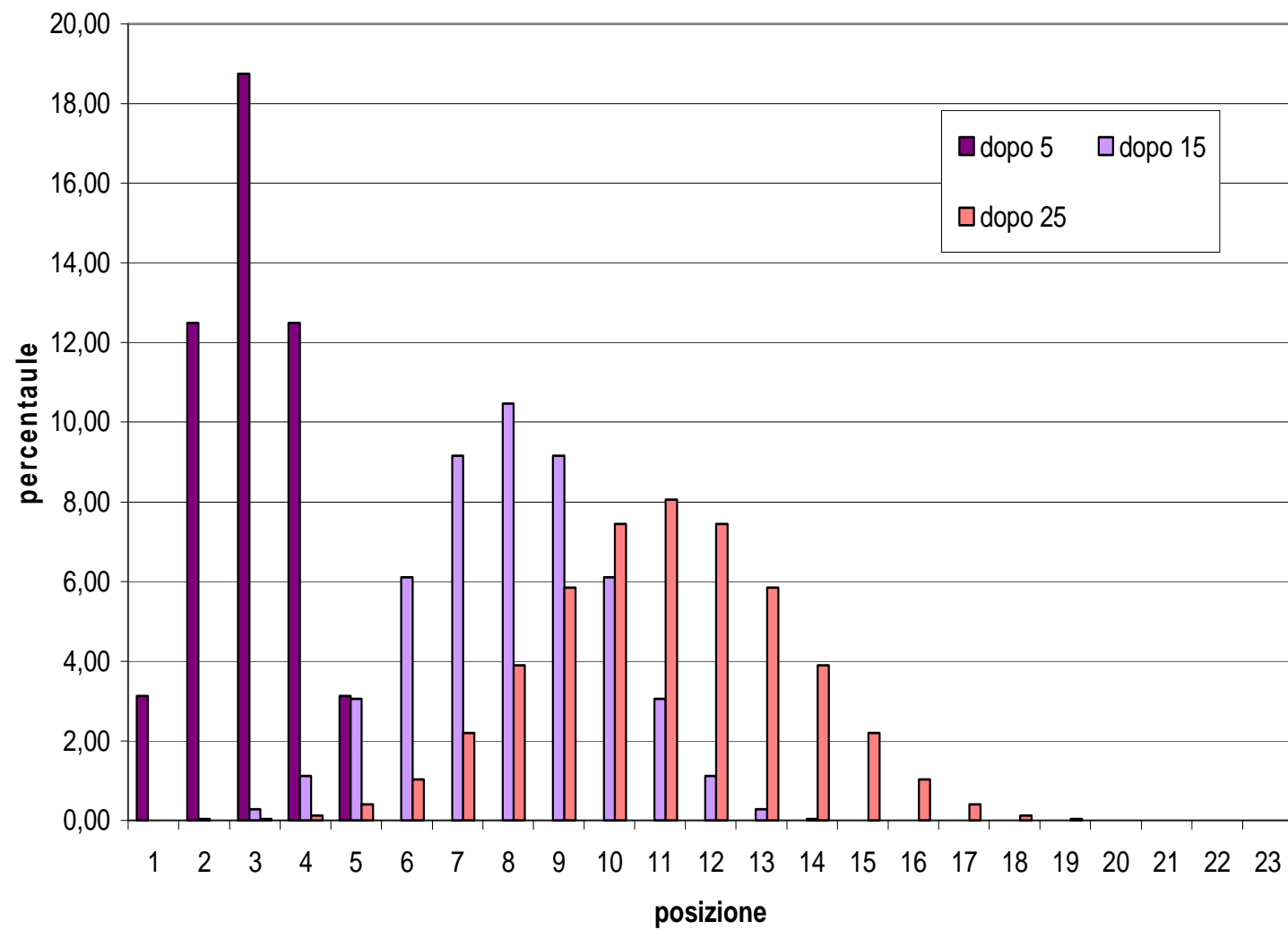
1 (le due fasi sono in equilibrio quando contengono le stesse concentrazioni)

2,33 (equilibrio con una concentrazione nella f.m. 2,33 volte quella della f.s.)

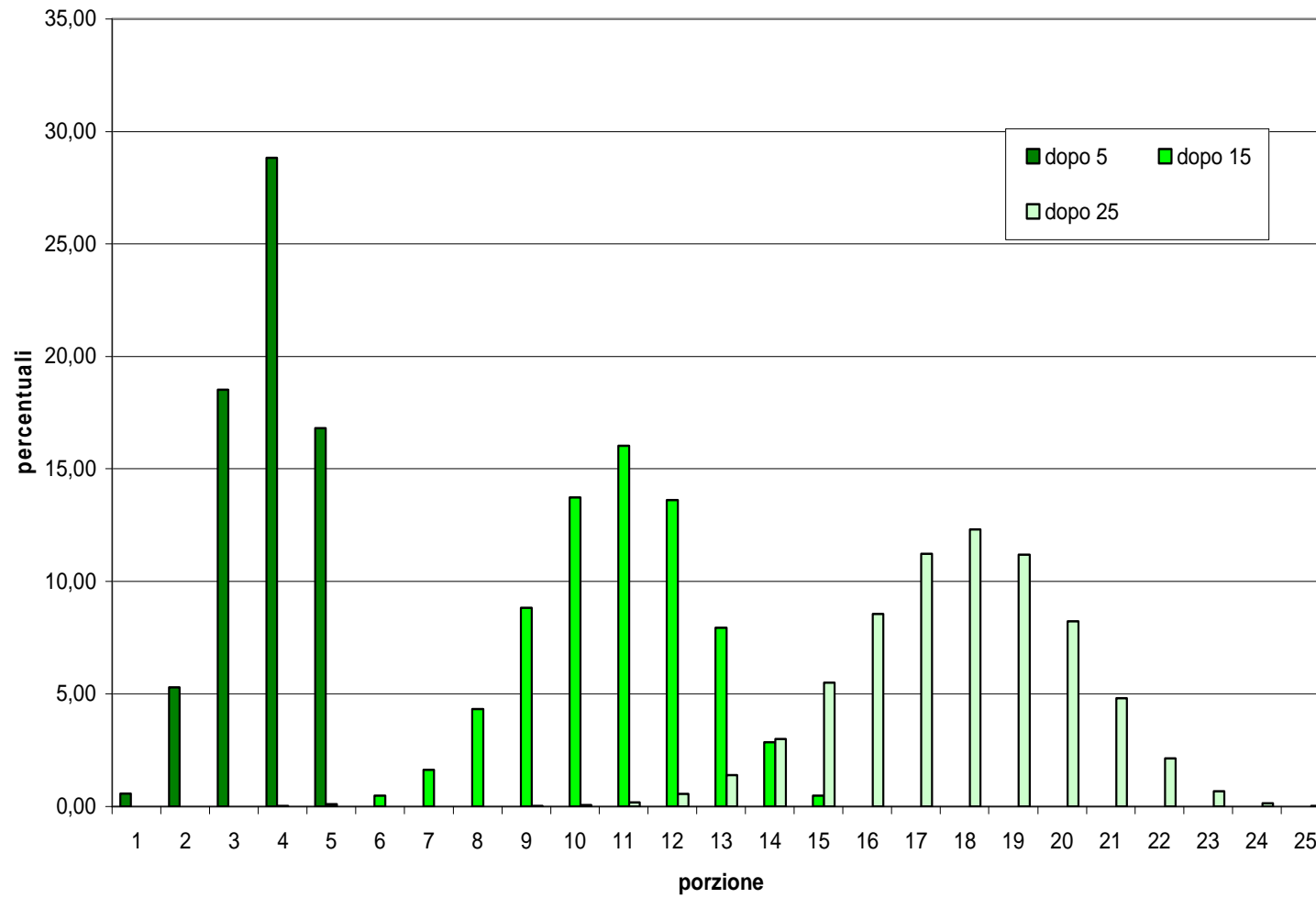
4 (equilibrio con una concentrazione nella f.m. 4 volte quella della f.s.)

9 (equilibrio con una concentrazione nella f.m. 9 volte quella della f.s.)

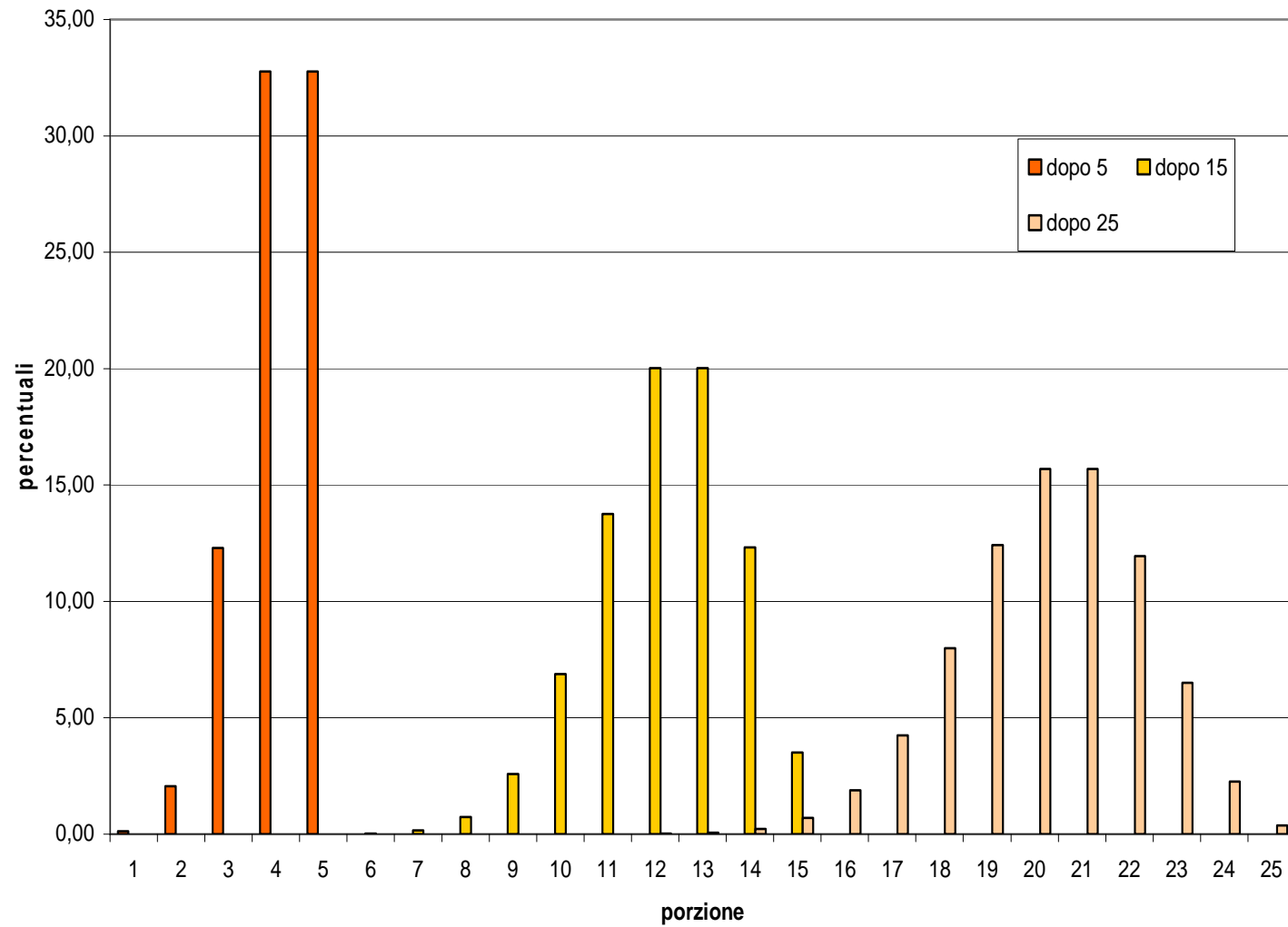
rapporto 1



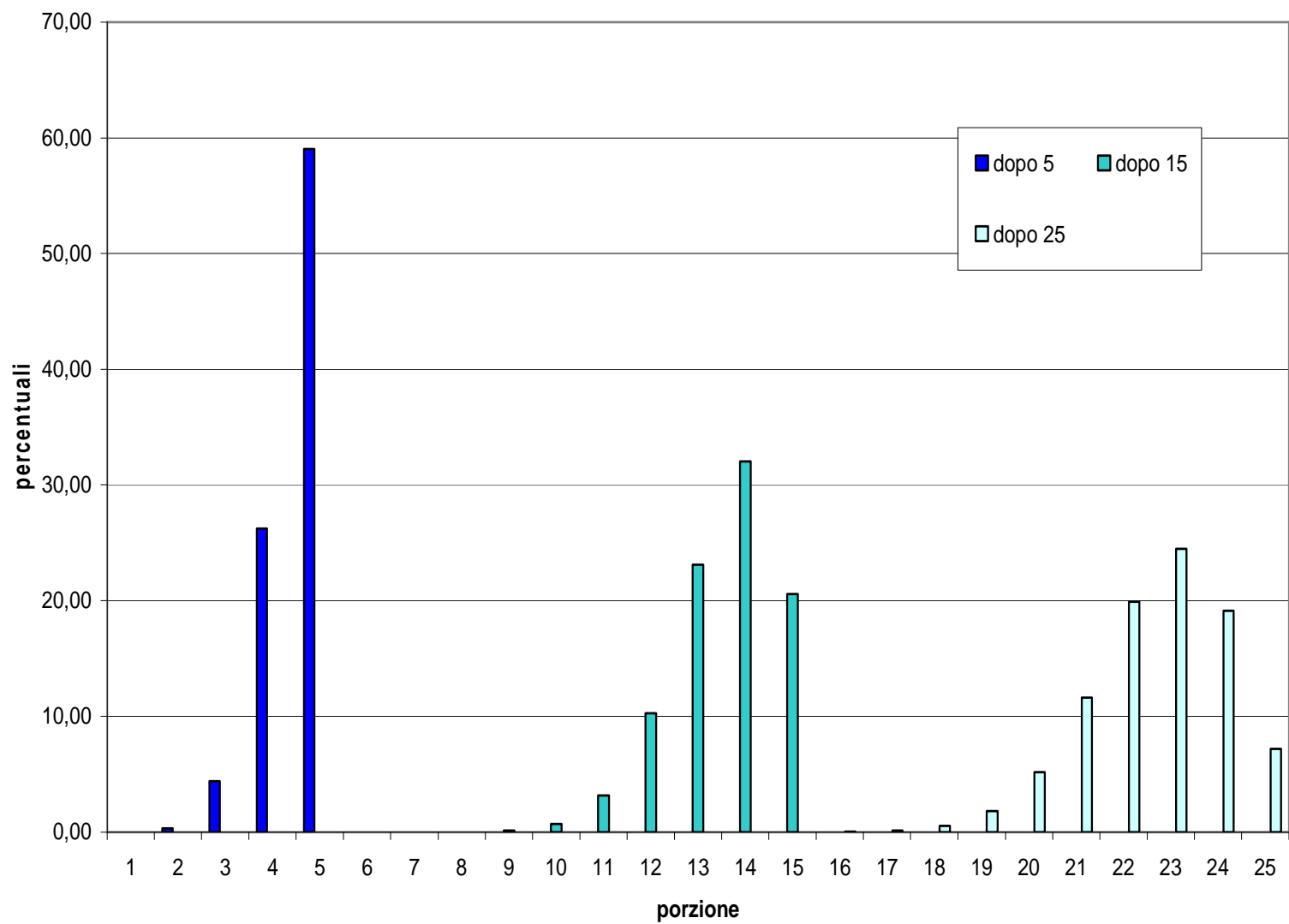
rapporto 2,33

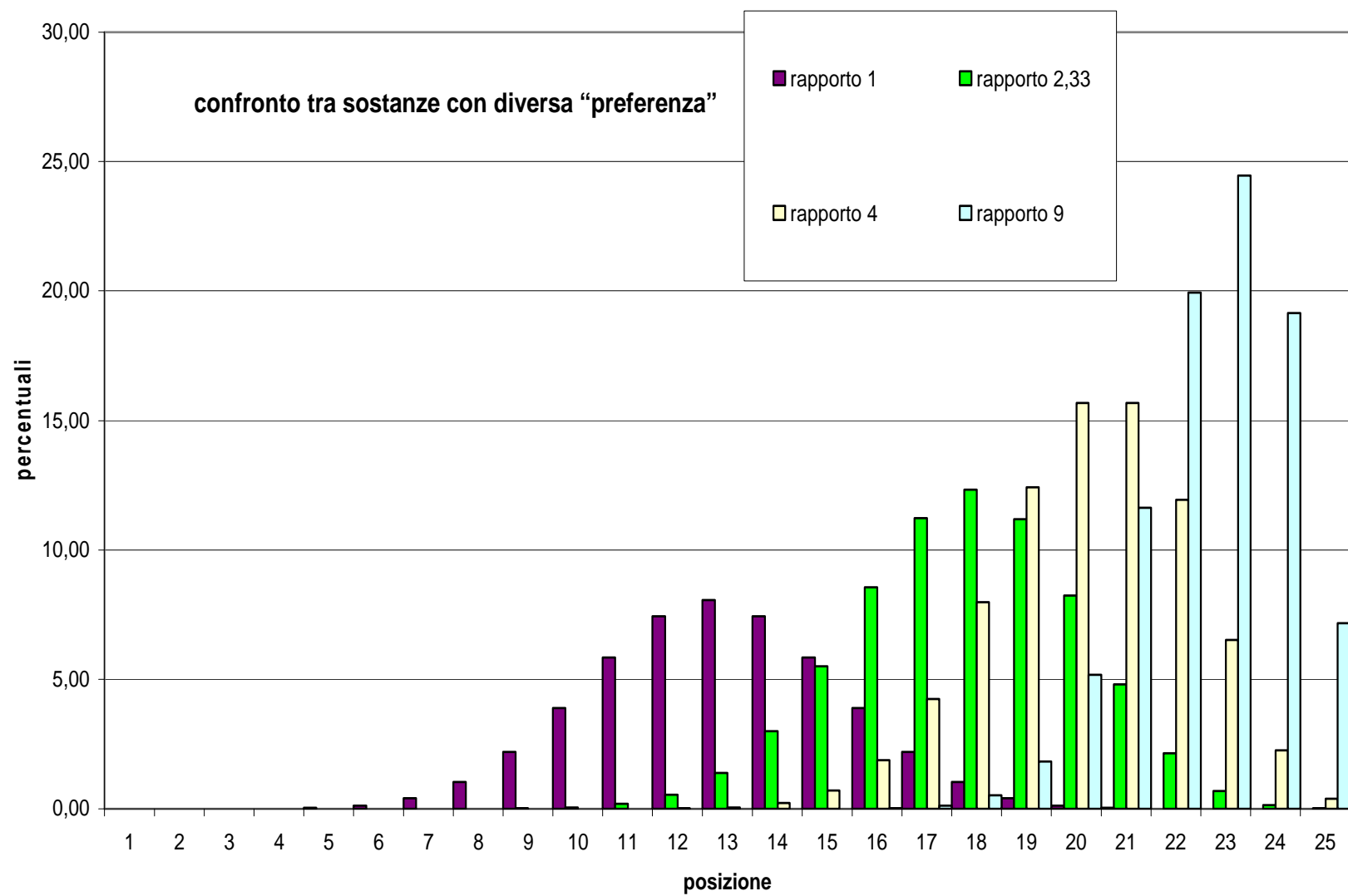


rapporto 4



rapporto 9



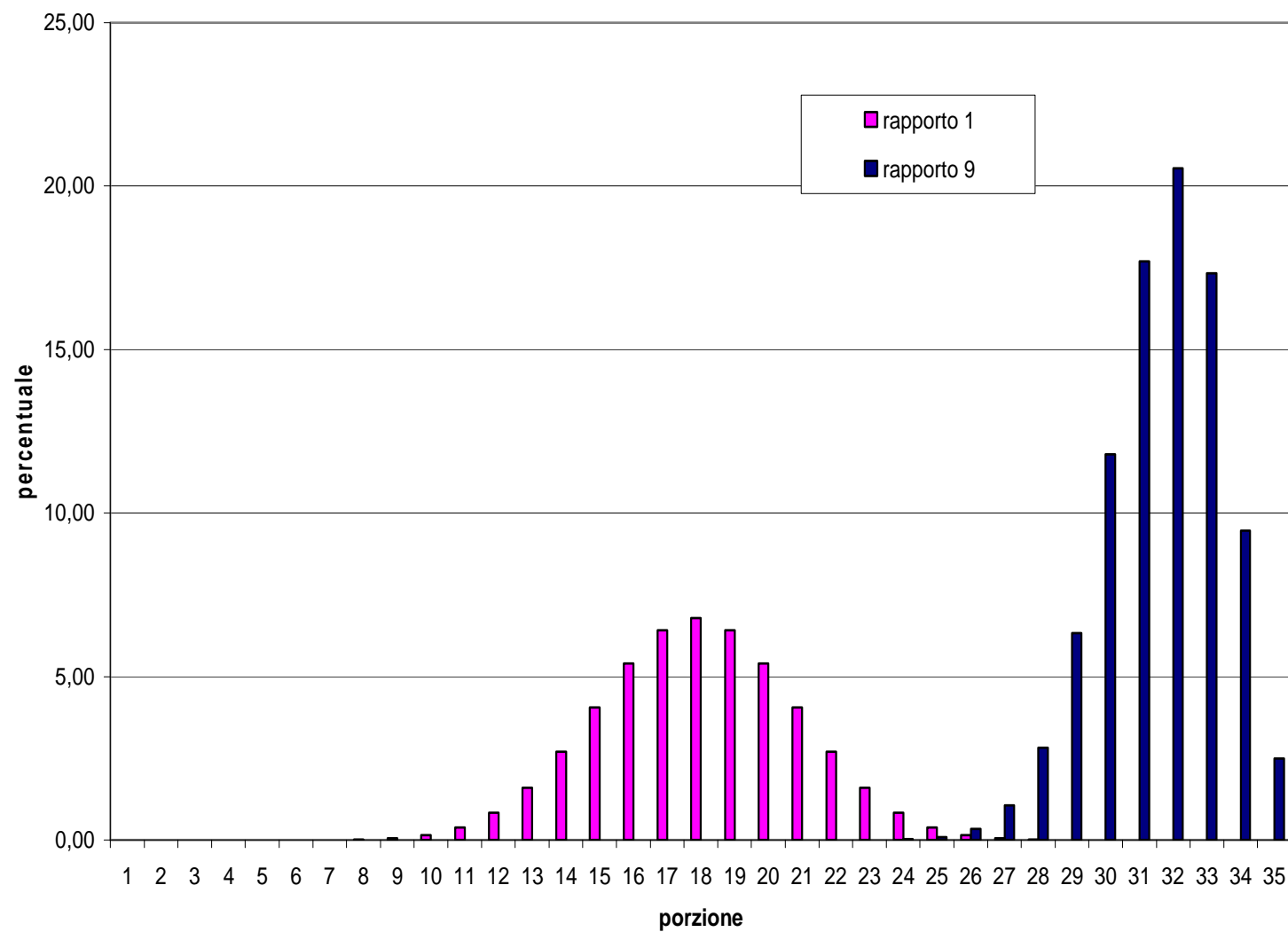


Come si vede dal grafico, questa particolare miscela non può essere risolta, cioè separata nei suoi componenti in soli 25 passaggi.

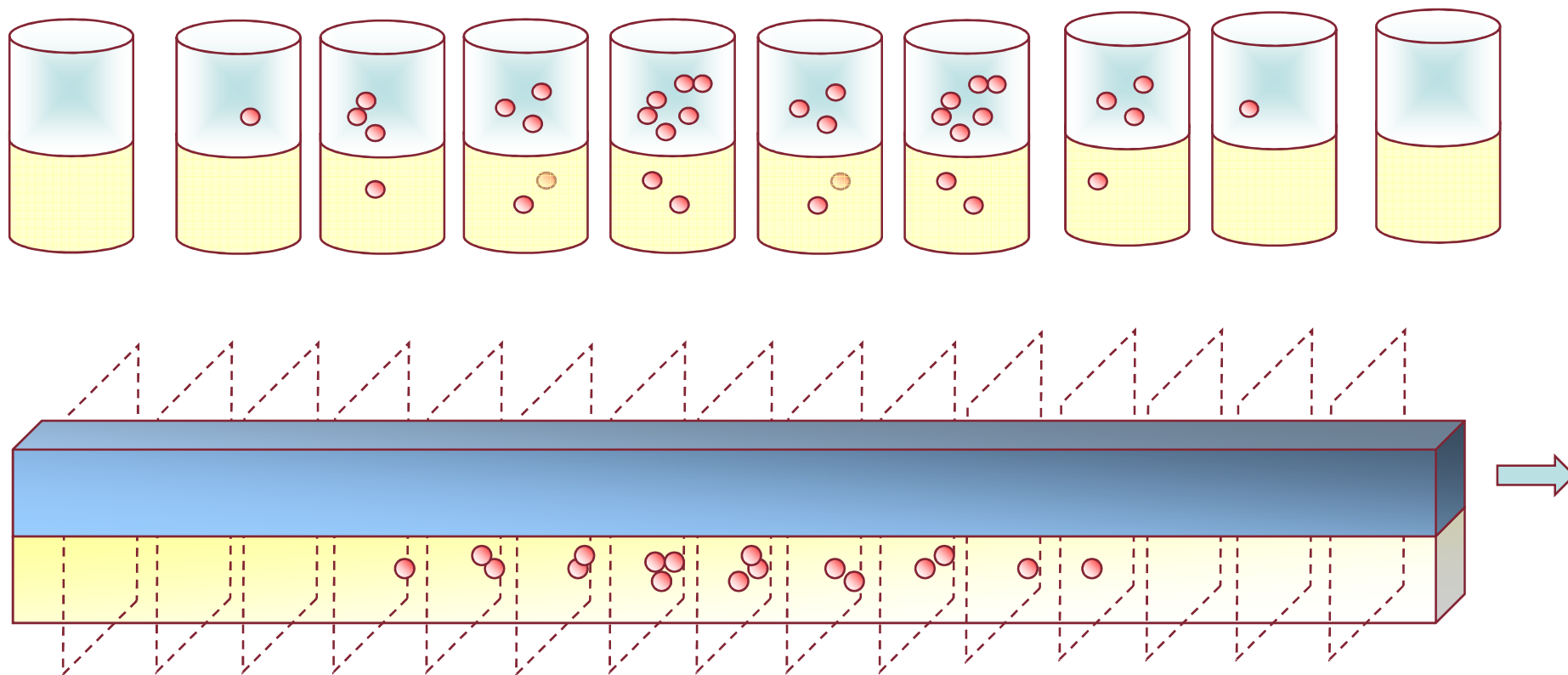
Per semplicità consideriamo una miscela formata dalle due sostanze con comportamento estremo.

Il grafico della diapo successiva mostra che dopo 35 spostamenti esse sono state risolte.

due sostanze diverse dopo 30 spostamenti



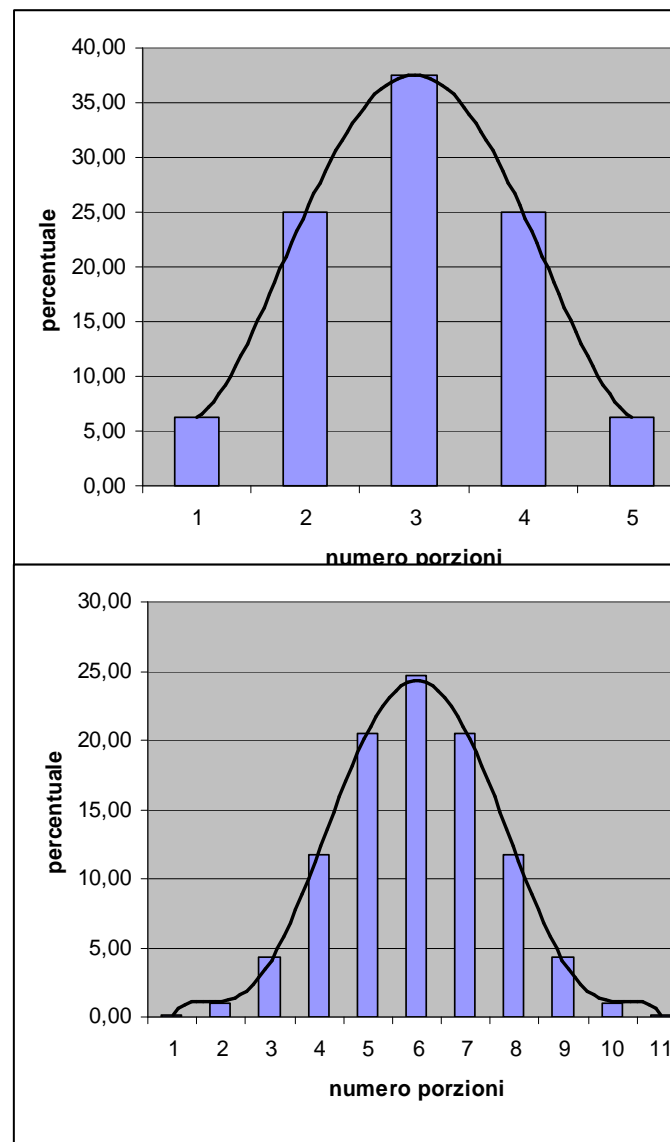
Si può pensare che l'operazione venga effettuata da volumi di solventi che non siano divisi fisicamente. Un flusso di fase mobile che scorra sulla fase stazionaria può essere considerata la versione continua del processo discontinuo che abbiamo appena analizzato.



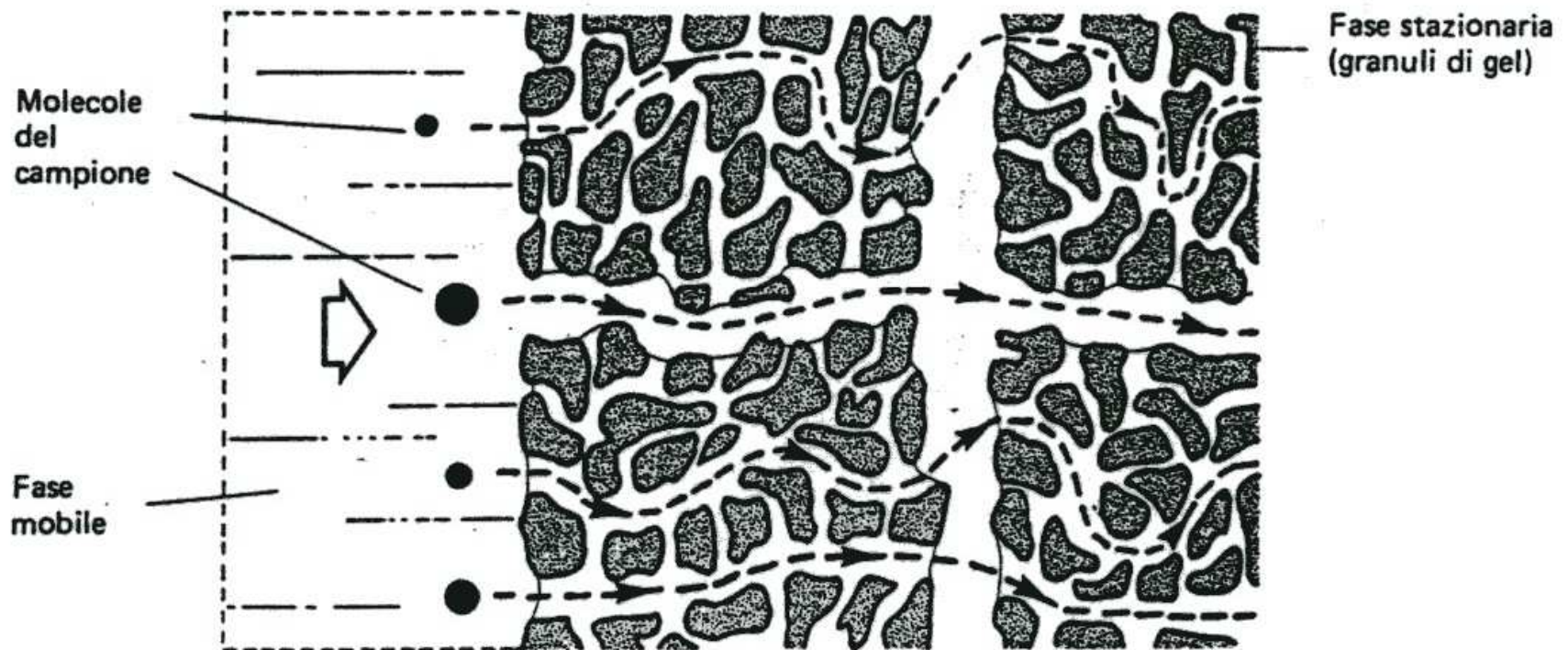
Anche in questo caso la sostanza, viene trascinata in avanti dalla fase mobile presentando concentrazioni maggiori nella zona centrale della banda occupata.

Al diminuire delle dimensioni delle porzioni di soluzioni studiate cresce il loro numero. Contemporaneamente, il grafico che rappresenta l'andamento della concentrazione sarà caratterizzato da barre sempre più ravvicinate.

All'aumentare del numero delle porzioni in cui è stata suddivisa la soluzione, congiungendo gli estremi delle barre si otterrà una curva il cui andamento diventa sempre più prossimo a quello di una gaussiana (curva a campana), coincidendo con essa per un numero elevatissimo di equilibrazioni.



Cromatografia



I meccanismi della separazione

La separazione cromatografica si attua sfruttando, in modo particolarmente efficiente, la diversa attitudine che ogni molecola o ione possiede nel distribuirsi fra due differenti fasi.

Le interazioni che si instaurano tra sostanza e le due fasi (mobile e stazionaria) sono spesso legami chimici secondari, sebbene in certi casi si arriva a meccanismi più complessi come lo scambio ionico.

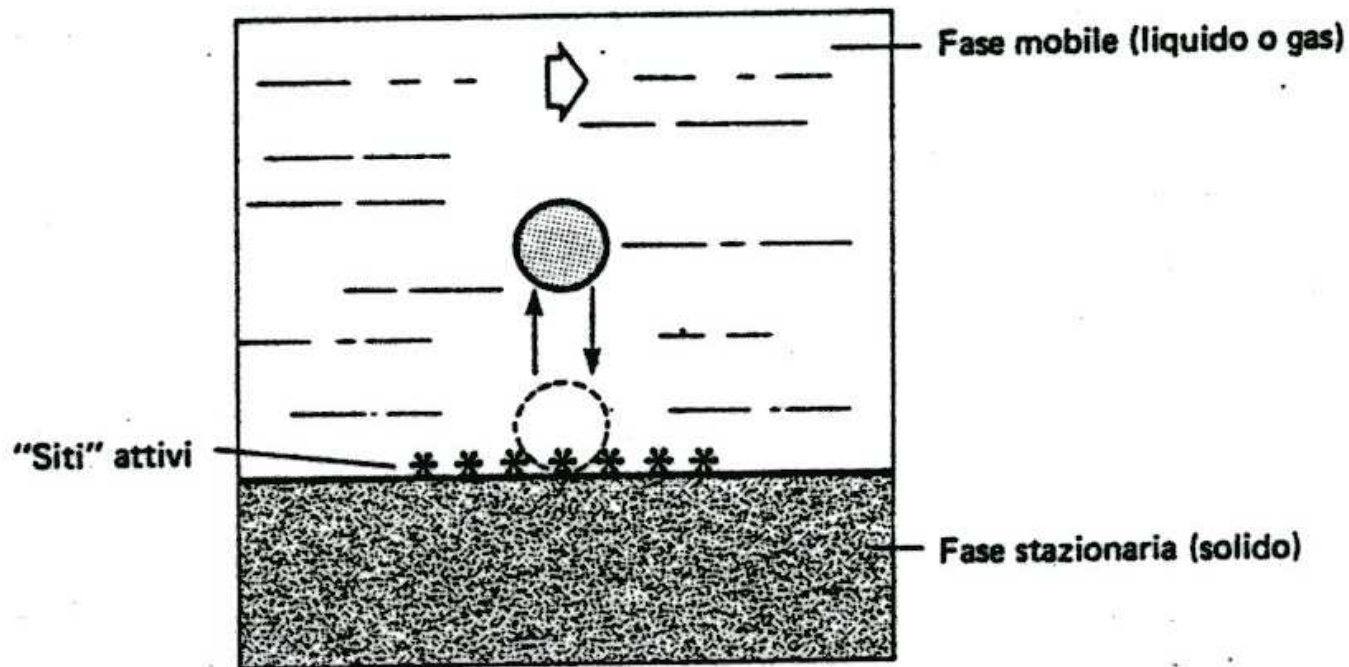
I meccanismi di separazione cromatografici si basano su

- adsorbimento,
- ripartizione,
- scambio ionico
- esclusione,
- affinità.

Le differenti tecniche cromatografiche vengono classificate proprio in base a quale è il meccanismo principale della separazione.

Adsorbimento

L'adsorbimento è quel fenomeno che determina il vincolarsi di una sostanza a un solido. Ciò perché sul solido ci sono i cosiddetti "centri attivi" ovvero raggruppamenti di atomi grazie ai quali esso si lega, con legami chimici secondari, ai componenti della miscela e ne ritarda il procedere.



Vari sono i fattori che influenzano il fenomeno dell'adsorbimento:

- Struttura reticolare del solido;
- Stato fisico del solido adsorbente: si intende praticamente la superficie di reazione che deve essere la massima possibile;
- Struttura molecolare dell'adsorbito: la polarità di una molecola influisce sulla sua attrazione con i "centri attivi" del solido. Le molecole con gruppi polari ($-\text{OH}$, $-\text{NH}_2$, ecc...) saranno più trattenute dal solido che quelle apolari;
- Temperatura e pressione: sono fattori contrastanti a riguardo dell'adsorbimento. Mentre l'aumento di temperatura causa un aumento dell'agitazione molecolare con conseguente rottura dei legami adsorbente/adsorbito, un aumento della pressione favorisce l'addensarsi di un componente gassoso sul solido.

L'adsorbimento quindi si basa sulla selettività del trattenimento dell'adsorbente nei confronti di adsorbiti diversi in base alle caratteristiche del solido adsorbente e alle condizioni interne (T e P) alla colonna.



Le interazioni che intercorrono tra le differenti sostanze e il solido con i suoi centri attivi sono paragonabili a ciò che succede quando due diverse palline scorrono su una tavola irta di chiodi. La diversa superficie delle palline, così come la diversa polarità delle molecole, assicurerà un maggior o minore trattenimento da parte delle punte dei chiodi, paragonabili ai centri attivi del solido.

Ripartizione

Quando la fase stazionaria è un liquido, si verifica una vera e propria solubilizzazione in essa dei componenti della miscela. Quando anche la fase mobile è liquida, i processi cromatografici sono governati dalla legge di ripartizione di Nernst.

Esse pertanto si ripartiscono fra le due fasi (immiscibili fra loro) in condizioni di equilibrio secondo un rapporto costante che dipende dalla solubilità del campione nei due solventi:

$$K = C_X / C_Y$$

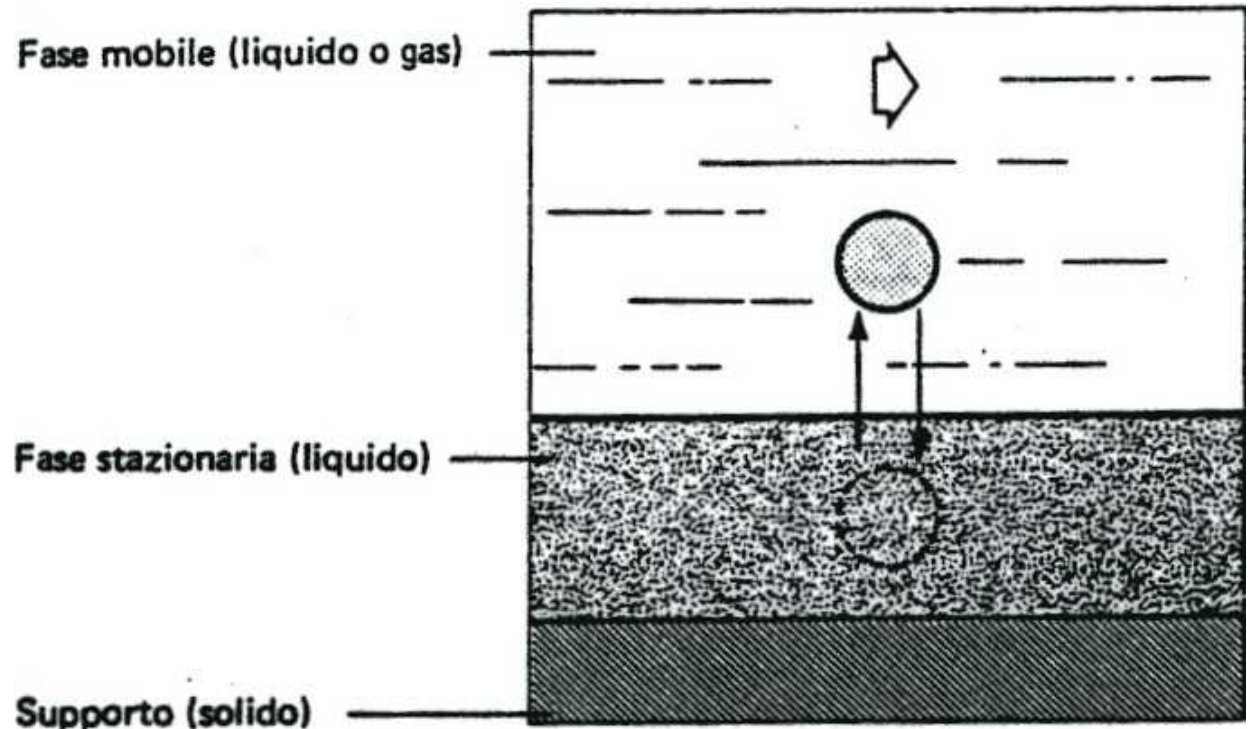
in cui:

K = coefficiente di ripartizione:
è costante a temperatura
costante,

C_X = concentrazione del soluto
nel solvente X,

C_Y = concentrazione del soluto
nel solvente Y.

I valori di K variano da
sostanza a sostanza ma
anche a seconda della
coppia di liquidi usata e
della temperatura.

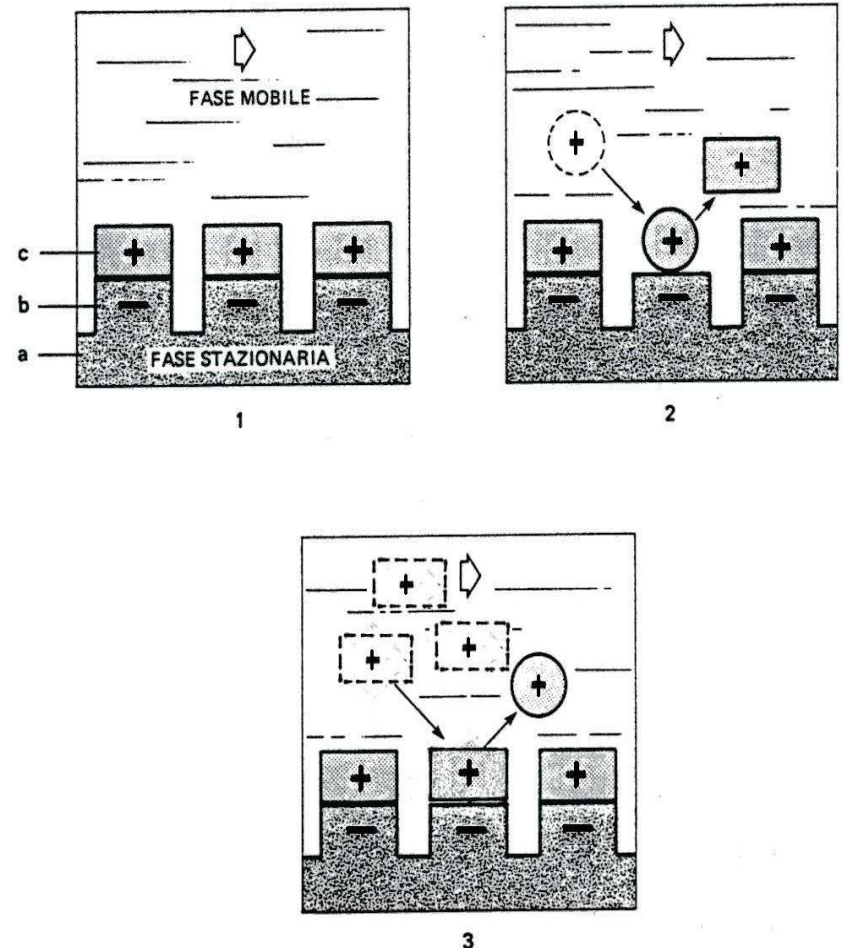


Scambio ionico

Si utilizza una resina con funzioni cariche bilanciate da ioni di segno opposto (1), per esempio $\text{-COO}^- \text{H}^+$.

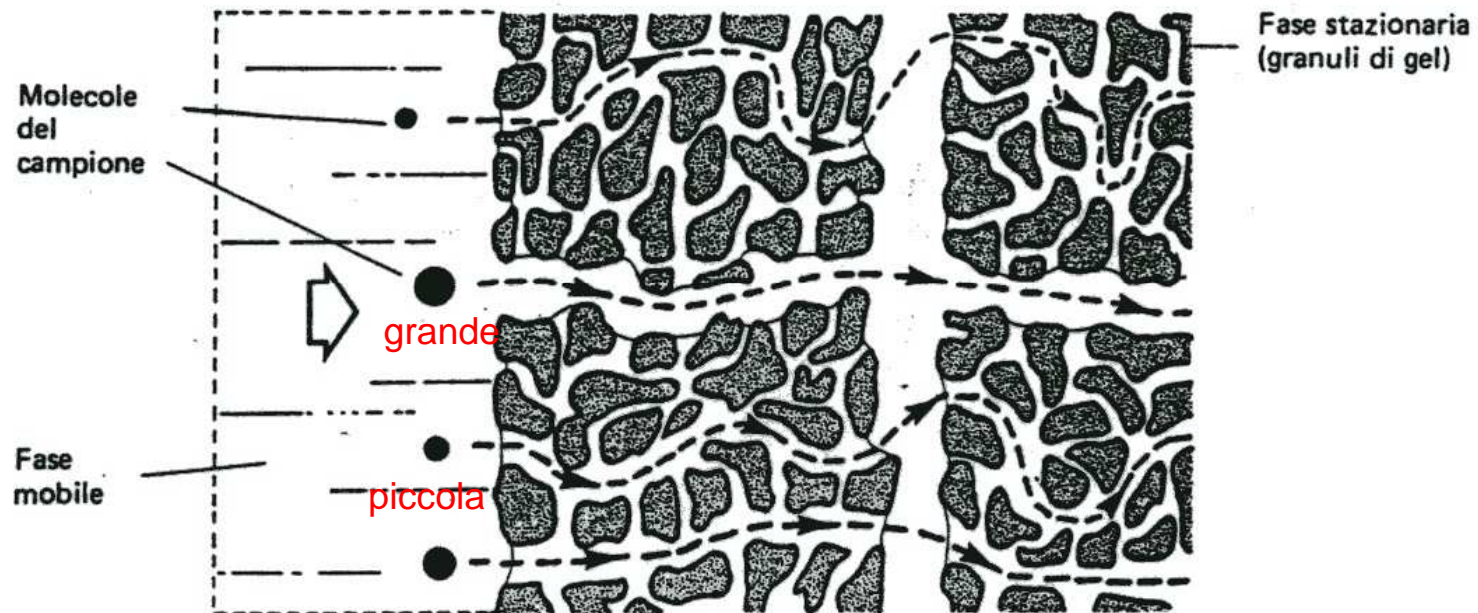
Queste funzioni sono in grado di scambiare i propri controioni (H^+ nell'esempio citato) con altri di segno uguale (Na^+ , Ca^{2+} , K^+ , etc.) provenienti dalla soluzione (2).

Facendo passare il controione originale della resina (H^+ nel caso illustrato) in elevata concentrazione, gli ioni provenienti dalla soluzione sono restituiti in modo differenziato, in funzione di carica e dimensioni, e quindi eluiti separatamente.



Esclusione

La fase stazionaria è un gel con pori di varie dimensioni. I componenti della miscela vengono separati in funzione delle loro dimensioni: quelli più piccoli possono penetrare in tutti i pori dei granuli e quindi sono trattenuti a lungo, mentre quelli più grandi possono solo “girare attorno” ai granuli di gel e quindi usciranno velocemente.

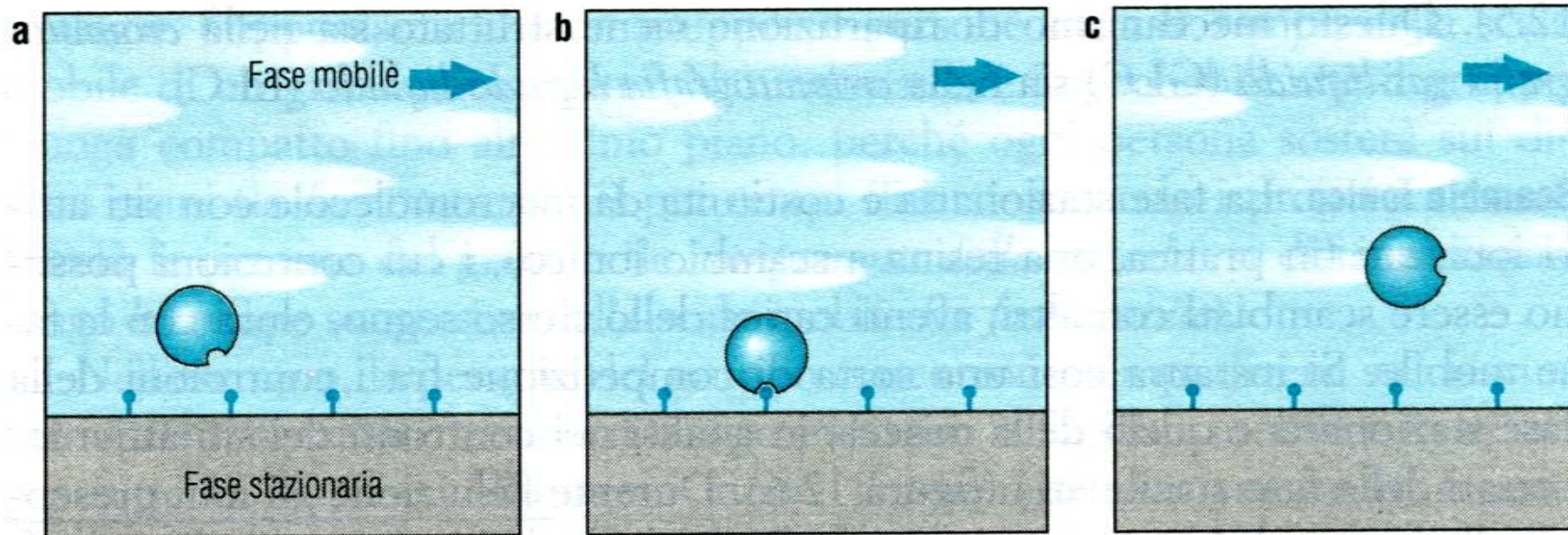


La tecnica è usata soprattutto per separare molecole organiche ad alto peso molecolare come proteine, acidi nucleici, carboidrati. Trova applicazione in campo biologico quando detti composti sono presenti in matrici complesse facilmente degradabili per altre vie.

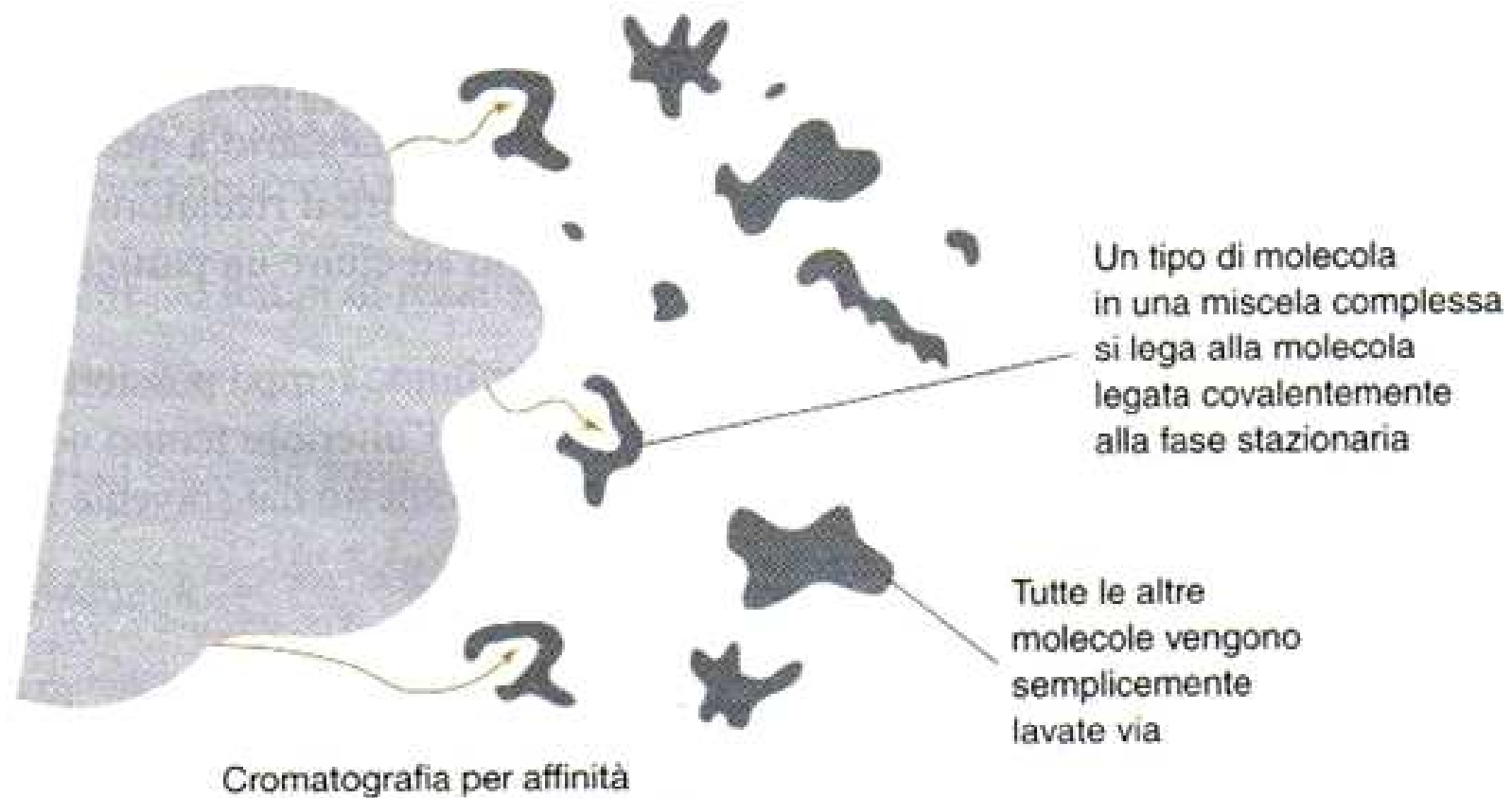
Affinità

Il comportamento è molto simile a quello dell'adsorbimento in quanto i componenti della miscela si legano a “siti attivi” della fase stazionaria (a e b). A differenza dell'adsorbimento, si hanno legami veri e propri (primari).

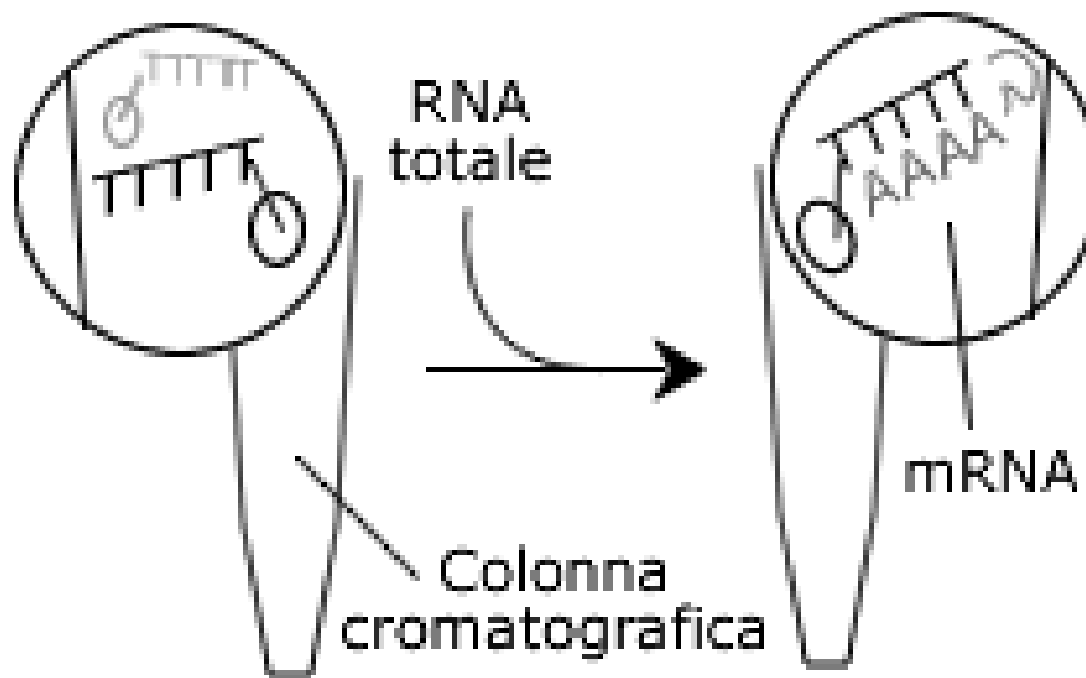
Le reazioni che li hanno formati sono comunque reversibili e facendo eluire un solvente opportuno è possibile restituire in modo differenziato i componenti che erano stati trattenuti (C).



Anche il meccanismo dell'affinità è legato all'ambito biochimico



Per esempio, si può isolare l'RNA messaggero che si differenzia dagli altri RNA (RNA transfert e ribosomiale), per la presenza di una coda di poly A. Da un estrazione di RNA totale della cellula (lisi, centrifugazione, DNAsi), faccio una cromatografia per affinità usando una resina particolare in cui siano presenti dei poly T. In questo modo posso estrarre e purificare i miei RNA messaggeri.



A seconda di quale sia il meccanismo prevalente e di come si presentino la fase stazionaria e quella mobile si possono avere più tecniche cromatografiche che vanno da un semplice foglio di carta porosa che pesca in una bacinella contenente il solvente, a strumenti assistiti da componenti computerizzati.

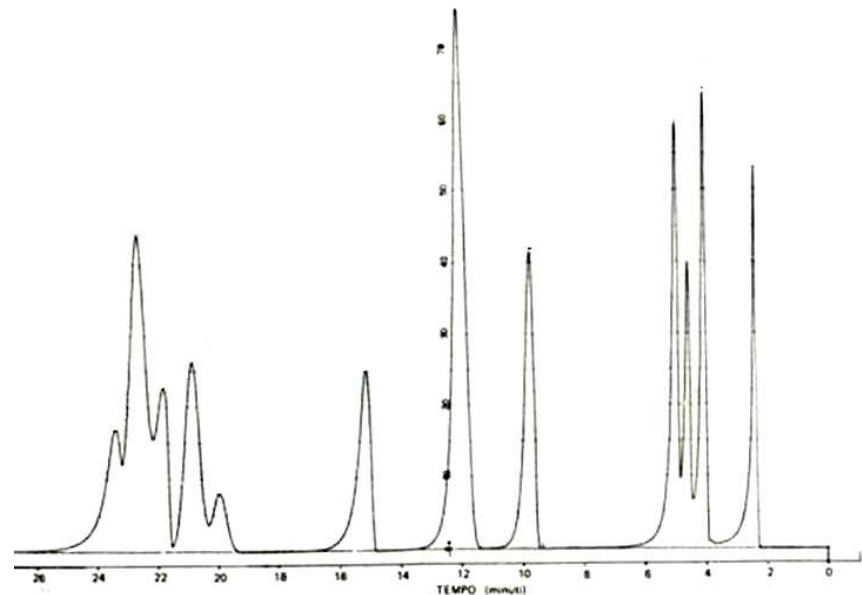
Fase mobile	Strumentazione	Principio di separazione	Tecnica
liquida	colonna	ripartizione	LLC cromatografia liquido/liquido
		adsorbimento	LSC cromatografia liquido/solido
		scambio ionico	IEC cromatografia a scambio ionico
		esclusione	GPC cromatografia a permeazione di gel
	strato sottile	ripartizione	TLC cromatografia su strato sottile
		adsorbimento	TLC cromatografia su strato sottile
gassosa	cromatografo liquido	scambio ionico	TLIEC cromatografia a scambio ionico su strato sottile
		ripartizione	HPLC cromatografia ad alte prestazioni
	gascromatografo	ripartizione	GLC cromatografia liquido/gas
		adsorbimento	GSC cromatografia gas/solido

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	$w_{h/2}$
Larghezza della base	w_b
Distanza tra i punti di flesso	w_i

tra loro esistono le relazioni

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

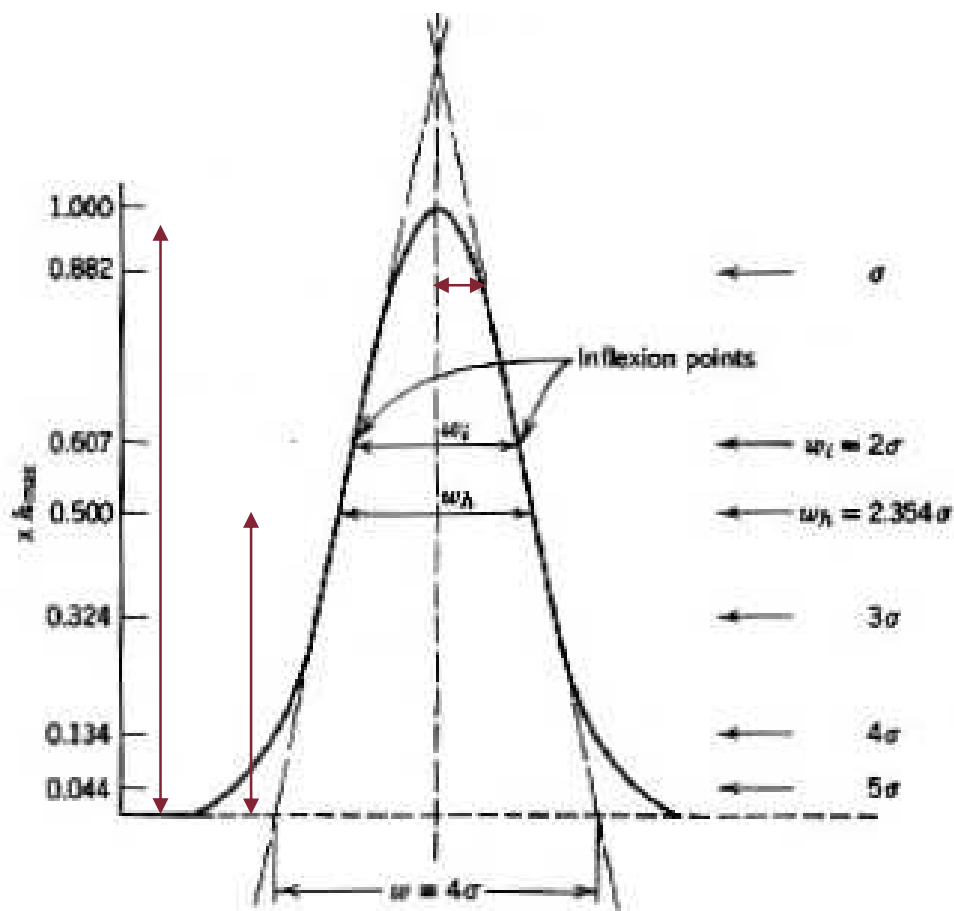
$$w_b = 1,699 w_{h/2}$$

$$w_h = 1,177 w_i$$

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

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

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

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

