

# Laboratorio di Preparazioni Estrattive

## La Cromatografia

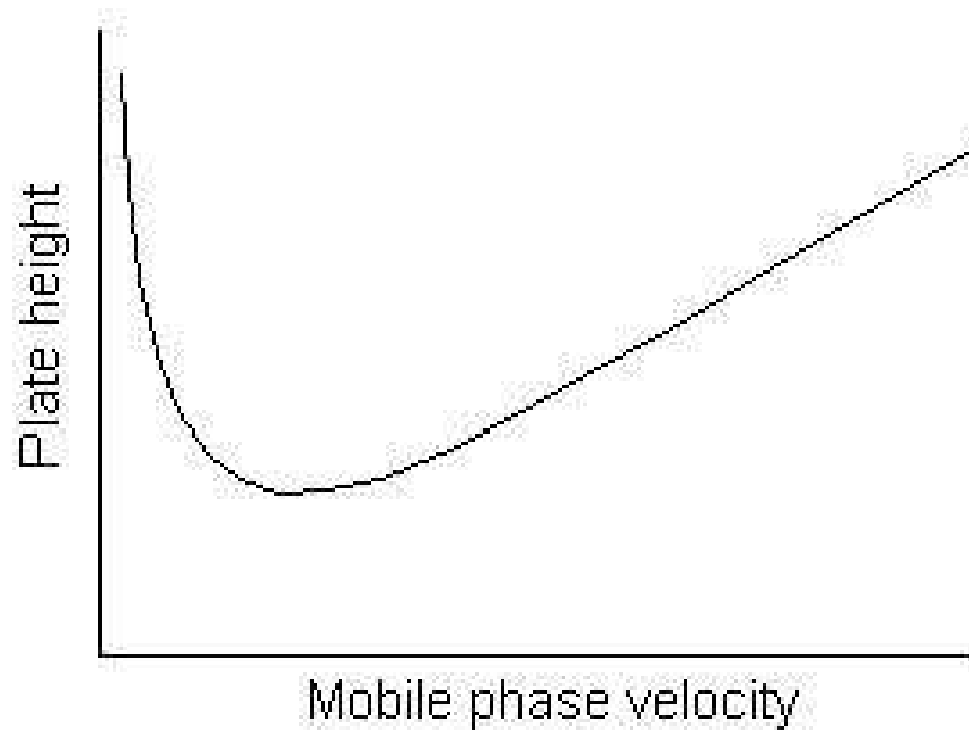


SAPIENZA  
UNIVERSITÀ DI ROMA

Abbiamo visto che per efficienza di una colonna si intende la sua capacità di mantenere compatti i picchi lungo il percorso e quindi all'uscita.

Tale grandezza, in omaggio al parallelismo con una colonna di distillazione (fatto da **Martin** e **Synge** nel 1941), viene evidenziata con l' **altezza equivalente al piatto teorico** (Height Equivalent to a Theoretical Plate) abbreviata con **H**.

Se si fanno più misure sperimentali di  $H$  a differenti valori della velocità della fase mobile, si trova che l'andamento di  $H$  è molto complesso



La spiegazione di tale andamento non può essere ricercata semplicemente nelle  $K_d$  (o nelle  $k$ ) poichè esse non variano.

L'attenzione è stata allora posta sui fenomeni che rallentano il raggiungimento dell'equilibrio e quindi il non rispetto totale delle  $K_d$ .

E' stata così formulata, da **Giddings**, la teoria del non-equilibrio; a lui si deve appunto l'individuazione dei fenomeni che ostacolano l'instaurarsi degli equilibri tra le due fasi nel sistema cromatografico.

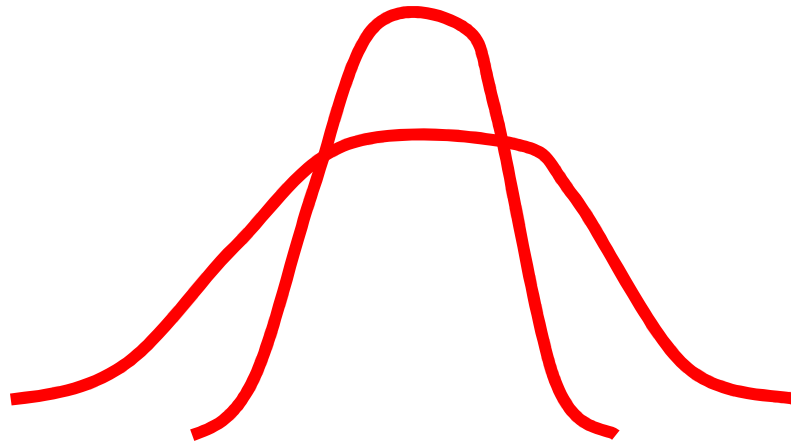
Sulle basi di tale teoria è stata sviluppata, da **Van Deemter** e collaboratori, l'equazione che correla  $H$  con la velocità lineare della fase mobile ( $u$ ):

$$H = A + B/u + C \cdot u$$

I fenomeni che rallentano il raggiungimento dell'equilibrio sono tre:

- percorsi multipli (eddy o multipath diffusion)
- diffusione molecolare longitudinale
- resistenza al trasferimento di massa

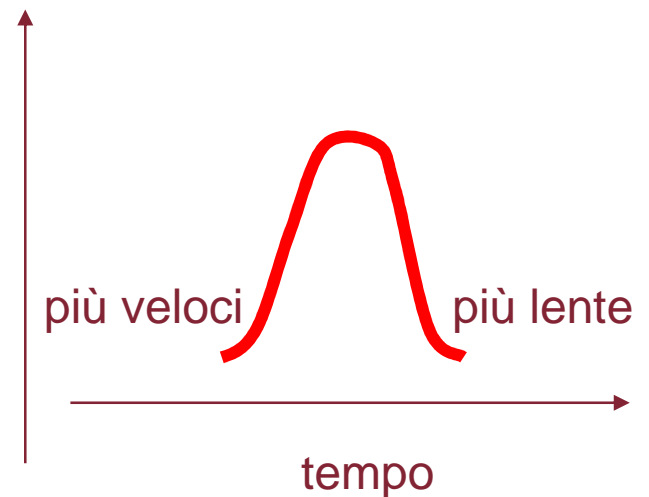
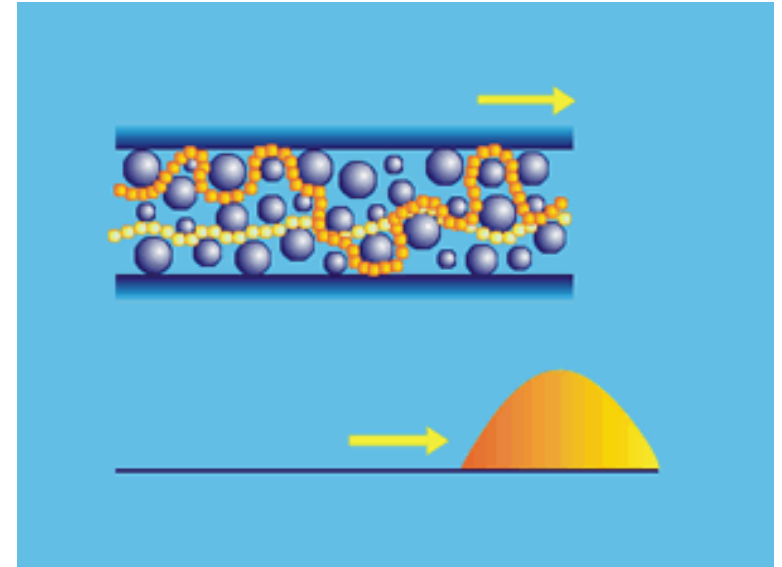
Tutti e tre causano un allargamento della banda e quindi perdita di efficienza della colonna verso una data sostanza

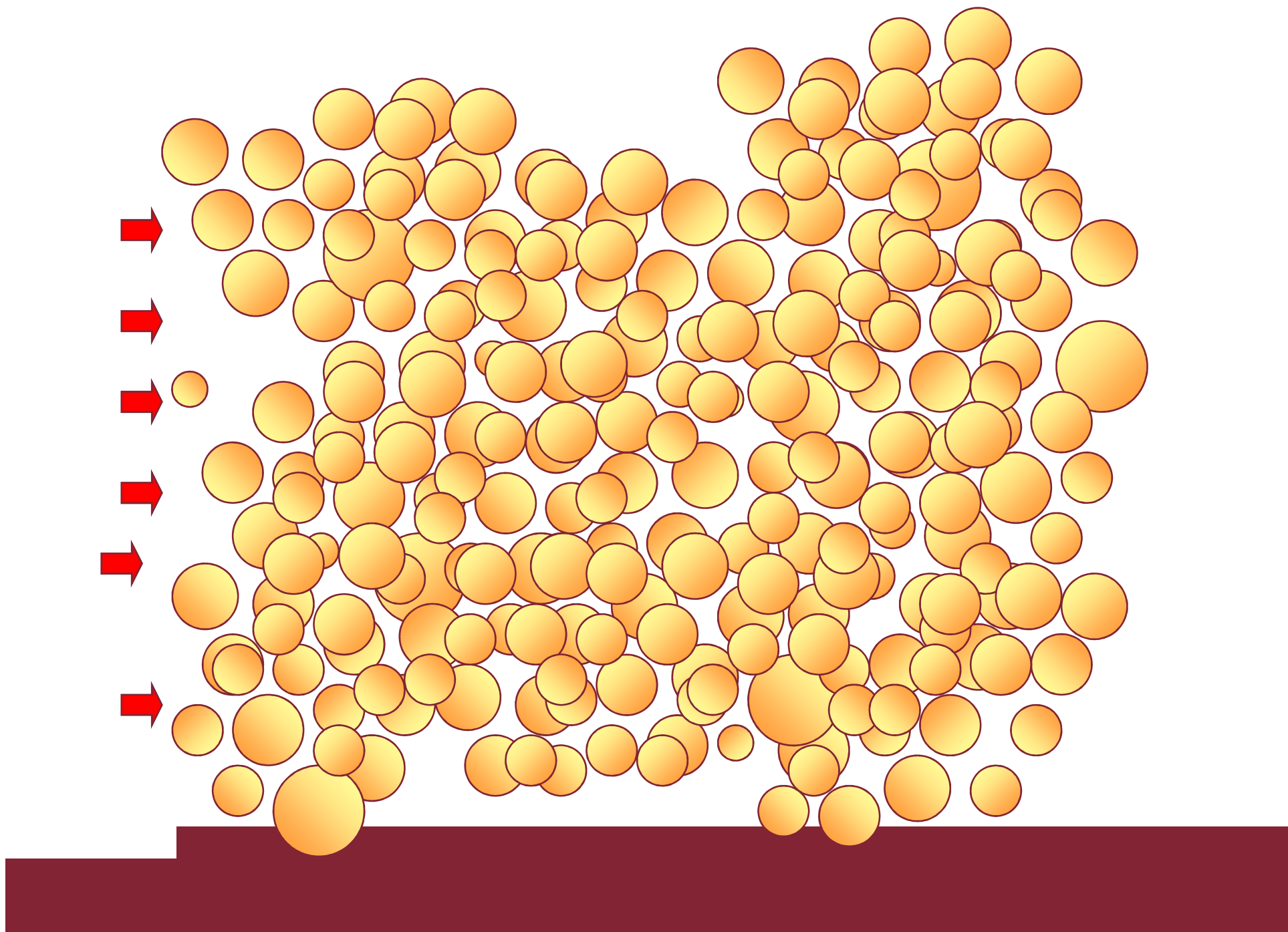


# Percorsi multipli

Le inevitabili differenze di dimensioni delle particelle solide che costituiscono la fase stazionaria (o il supporto che la sostiene) fanno procedere le molecole della sostanza in analisi secondo strade diverse.

Nel loro moto casuale, alcune molecole arriveranno prima, altre dopo, con il risultato globale di far allargare la banda in uscita dalla colonna





Due sono le soluzioni teoricamente possibili:

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

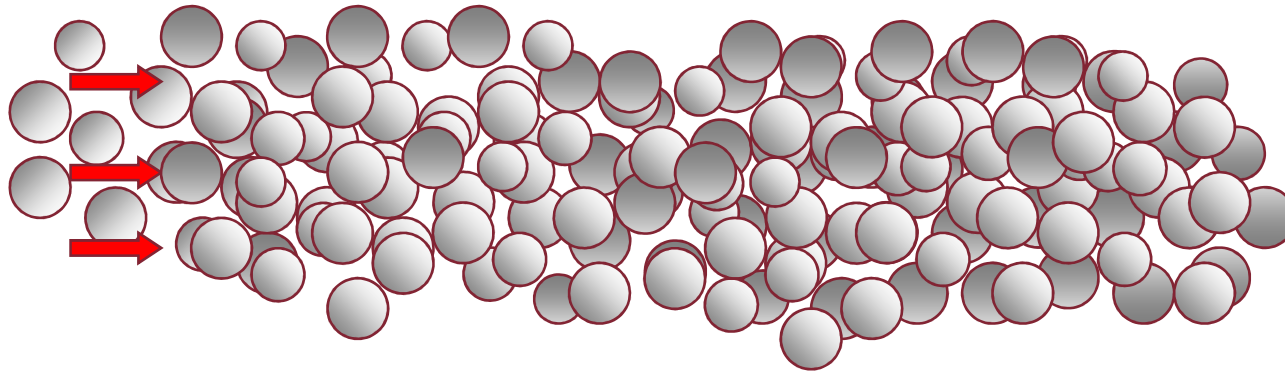
In realtà nessuna delle due è completamente applicabile.

Un abbassamento eccessivo delle dimensioni dei granuli della fase stazionaria causerebbe problemi di intasamento della colonna e blocco della fase mobile mentre è, di fatto, impossibile ottenere granuli con dimensioni costanti.





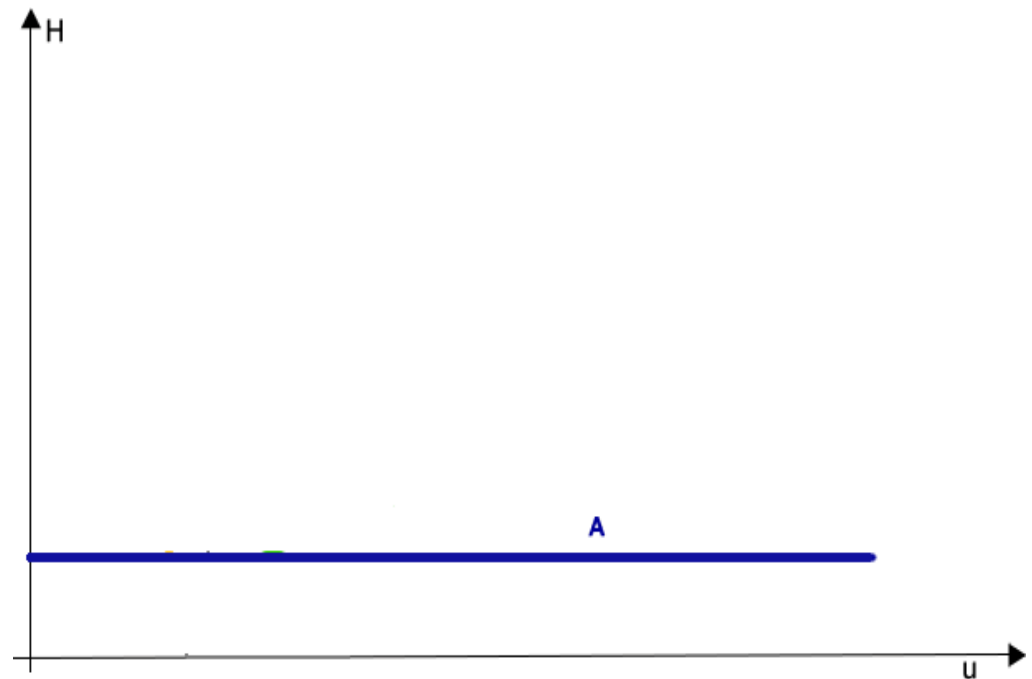
La soluzione migliore è quella di usare granuli quanto più omogenei possibili e dimensioni non tali da causare problemi all'apparecchiatura cromatografica



Rispettando queste caratteristiche si può avere la relativa certezza che le particelle utilizzeranno quasi lo stesso tempo per uscire e si minimizza il naturale allargamento della banda.

La diffusione multivorticoso è costante. Indipendentemente dalla velocità con cui la fase mobile trasporta le molecole della sostanza attraverso la fase stazionaria, la loro differenziazione avverrà sempre con la stessa distribuzione.

Nell' equazione di Van Deemter ( $H = A + B/u + C \cdot u$ ) il parametro che rappresenta questo fenomeno è indicato con A. Il suo contributo ad H, costante al variare del flusso (u), sarà raffigurato con una retta parallela alle x.



Il valore del parametro A può essere espresso come:

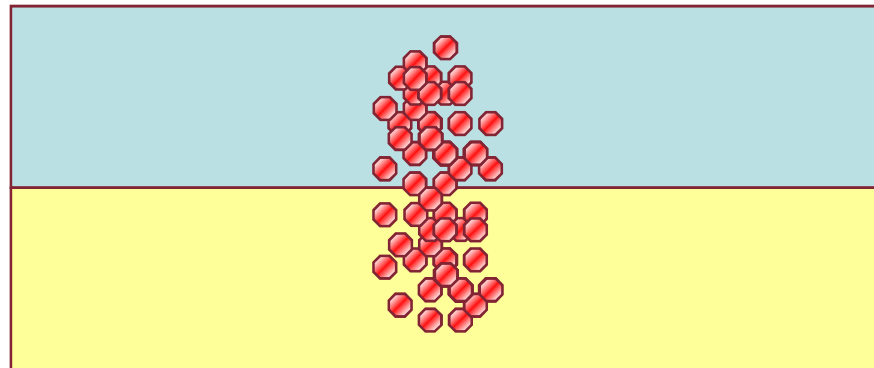
$$A = 2\lambda d_p \quad \text{dove}$$

- $\lambda$  è una costante associata alla granulometria (diametro delle particelle e loro distribuzione granulometrica) e all'impaccamento della colonna
- $d_p$  il diametro medio delle particelle di riempimento.

Come già anticipato qualitativamente, si vede anche dalla relazione che per minimizzare il suo valore occorre ridurre il diametro delle particelle della fase stazionaria e la loro distribuzione granulometrica, oltre a migliorare l'impaccamento. Attualmente il termine A incide molto poco sul valore di H.

# Diffusione molecolare longitudinale

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.

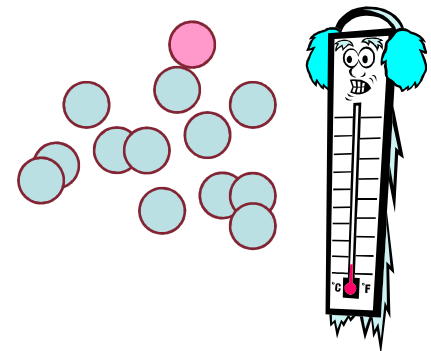
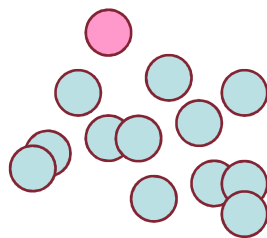


In realtà è più marcata la retrodiffusione rispetto alla diffusione nella direzione di avanzamento della fase mobile.

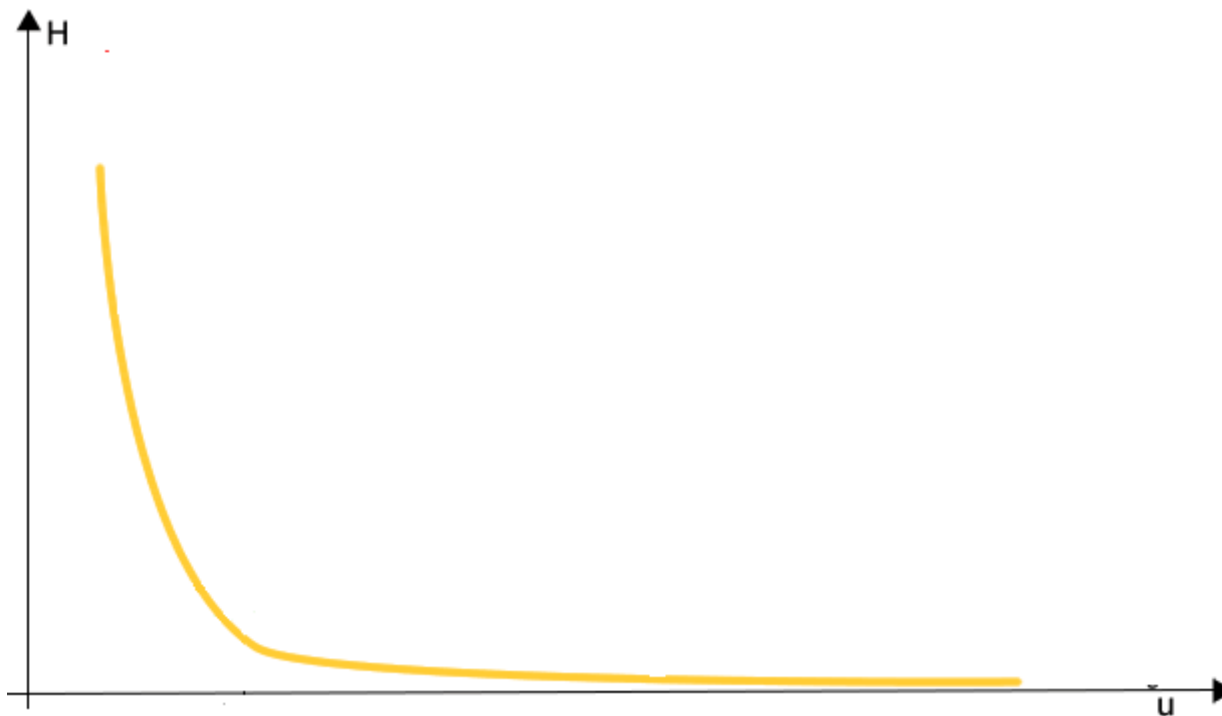
Il fenomeno è tanto più favorito quanto meno è viscosa la fase e per questo stesso motivo è più accentuato nella fase mobile che in quella stazionaria.

Anche il tempo di permanenza è importante: più a lungo la sostanza rimane nella colonna e più tempo ha a disposizione per diffondere.

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.



Nell' equazione di Van Deemter ( $H = A + B/u + C \cdot u$ ) il parametro che rappresenta questo fenomeno è indicato con B. Il suo contributo ad H, inversamente proporzionale al variare del flusso (u), è raffigurato con un ramo di iperbole. Come si vede dal grafico il suo contributo all'altezza del piatto teorico cala prima velocemente e poi in maniera più blanda con il crescere del flusso

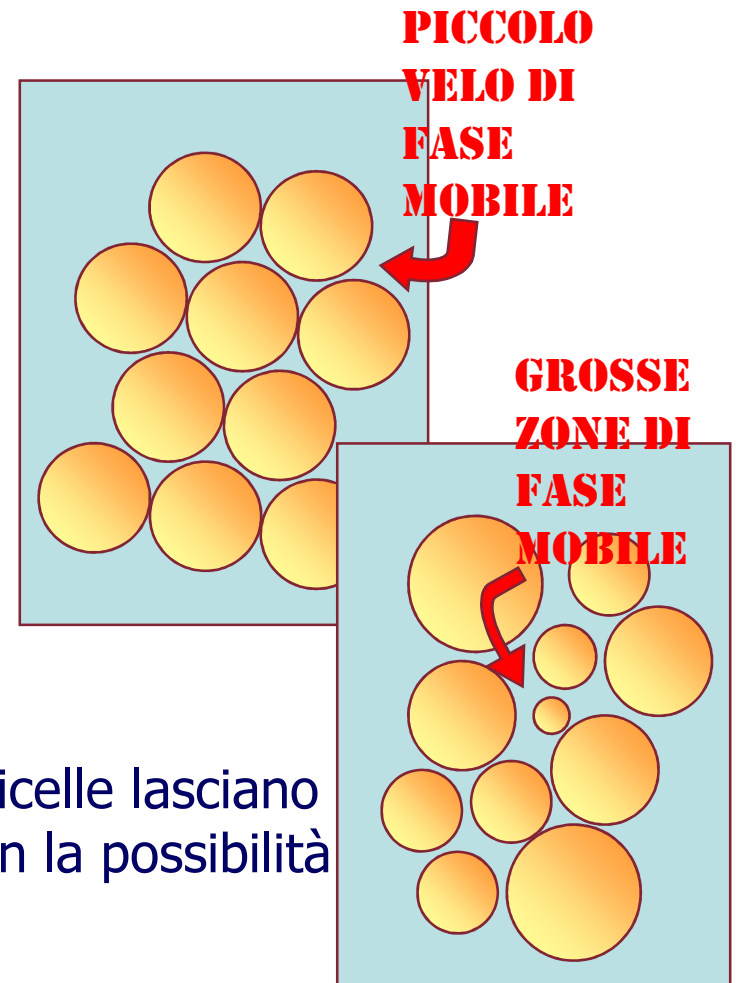


Il parametro B viene espresso come

$$B = 2\gamma D_M \quad \text{dove}$$

- $\gamma$  è il *fattore di tortuosità*, che dipende dall'impaccamento della colonna (vale a dire dalla geometria degli spazi disponibili per la fase mobile)
- $D_M$  il *coefficiente di diffusione* del soluto nella fase mobile, un parametro che riassume tutte le caratteristiche che influenzano la sua resistenza alla diffusione: densità e viscosità. Poiché valori alti di entrambe portano a piccoli coefficienti di diffusione, si spiega perché tale fenomeno sia più accentuato con un gas che con un liquido.

Per ridurre il valore di  $\gamma$  occorre usare particelle di dimensioni uniformi (ma non necessariamente piccole); in questo modo, infatti, l'impaccamento risulta più compatto e si riducono gli spazi in cui la fase mobile può consentire il fenomeno della diffusione longitudinale.



- Al contrario, dimensioni diverse delle particelle lasciano disponibili larghe zone alla fase mobile con la possibilità di dar luogo a consistenti diffusioni.
- La variabile  $u$ , che compare al denominatore, suggerisce, come già detto, di aumentare il flusso per minimizzare il contributo del termine al valore complessivo di  $H$ .



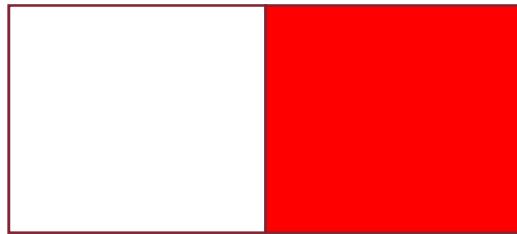
Stato fisico	Densità <b>g/cm<sup>3</sup></b>	Coefficiente di diffusione <b>cm<sup>2</sup>/s</b>	Viscosità <b>g/cm·s</b>
Gas	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-4</sup>
Fluidi supercritici	0,3-0,9	10 <sup>-3</sup> -10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-3</sup> -10 <sup>-4</sup>
Liquidi	1	<10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-2</sup>

- Il coefficiente di diffusione rappresenta l'area di allargamento al secondo: una sostanza ha più facilità di allargarsi in un mezzo con coefficiente di diffusione grande
- Può essere considerato il rapporto tra viscosità e densità.

$$\text{Infatti} = \text{g/cm} \cdot \text{s} / (\text{g/cm}^3) = \text{cm}^2/\text{s}$$

# Resistenza al trasferimento di massa

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

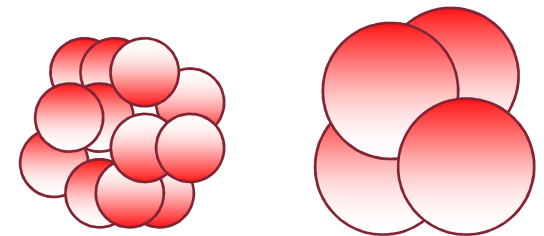
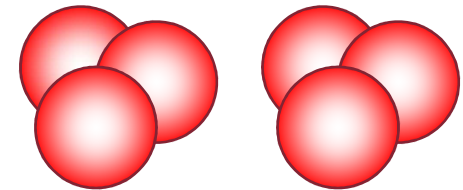
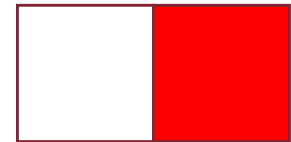


Il suo contributo al valore complessivo di  $H$  è il più importante di tutti gli altri.

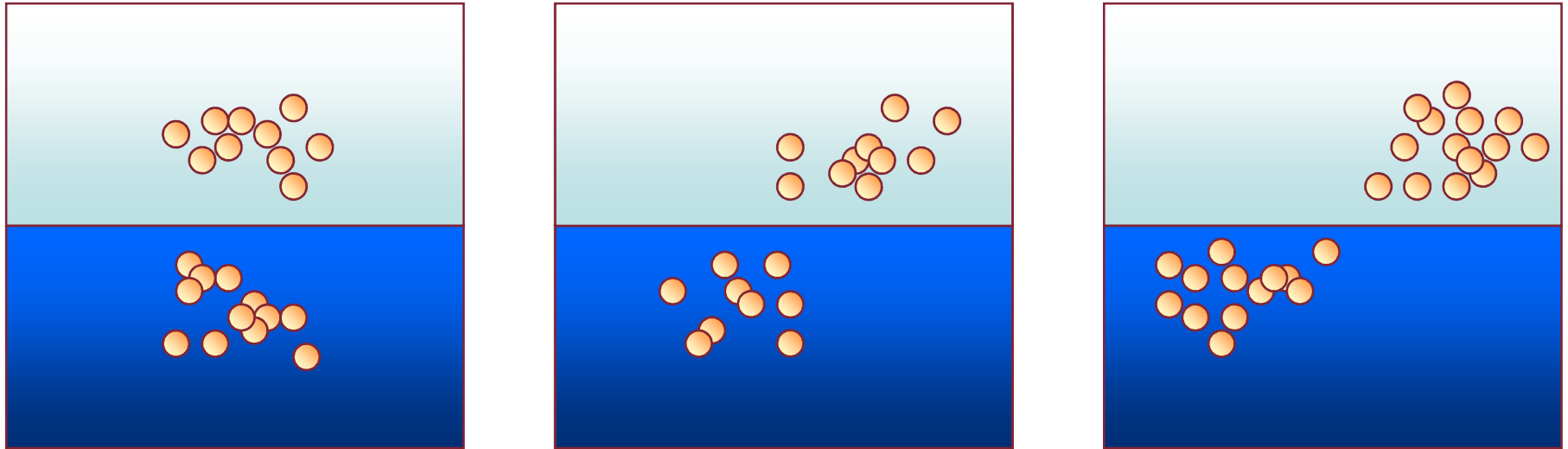


Su di esso incidono tutte quelle variabili che influenzano il passaggio di una sostanza da una fase all'altra e in particolare:

- solubilità della sostanza nelle due fasi
- temperatura
- viscosità, densità
- quantità del liquido di ripartizione
- estensione delle superfici attraverso cui l'equilibratura può avvenire



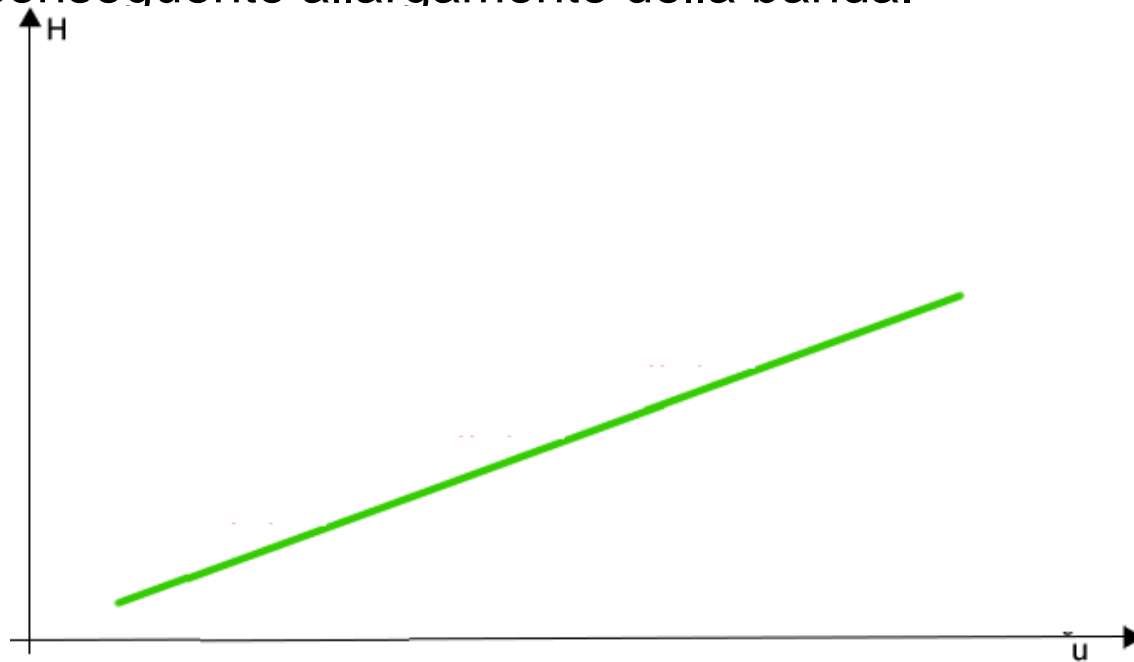
Per esempio, in gascromatografia, sarà molto più semplice il passaggio nella fase gassosa che in quella liquida, che è più densa e viscosa.



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

Nell' equazione di Van Deemter ( $H = A + B/u + C \cdot u$ ) il parametro che rappresenta questo fenomeno è indicato con C. Il suo contributo ad H, direttamente proporzionale al variare del flusso (u), è raffigurato con una retta.

Come si vede dal grafico il suo contributo all'altezza del piatto teorico cresce costantemente con il flusso della fase mobile: più veloce è la fase mobile e minore è il tempo che le fasi hanno per equilibrarsi e più sfasate saranno con conseguente allargamento della banda.



Il valore complessivo del termine  $C$  è fornito dall'equazione:

$$C = C_S + C_M \text{ dove}$$

- $C_S$  è il contributo relativo alla fase stazionaria
- $C_M$  è quello relativo alla fase mobile.

E' ovvio che lo stato fisico delle fasi fa sì che i due contributi non siano uguali.

Tutte le variabili indicate prima trovano rispondenza in parametri ben precisi legati alla natura delle fasi e a come una colonna è stata costruita.

Il parametro  $C_S$  viene espresso dalla relazione

$$C_S = q \cdot k \cdot d_f^2 / (1+k)^2 D_S \quad \text{dove}$$

$q$  è una costante legata alla disomogeneità della fase stazionaria\*

$k$  è il fattore di ritenzione\*

$d_f$  è lo spessore massimo della fase stazionaria\*

$D_S$  è il coefficiente di diffusione nella fase stazionaria

Tra i tre coefficienti costruttivi\*, quello su cui è più semplice operare per abbassare  $C_S$ , è ridurre lo spessore della fase stazionaria ( $d_f$ ).

Il parametro  $C_M$  viene espresso dalla relazione

$$C_M = \omega d_p^2 / D_M \quad \text{dove}$$

$\omega$  è una costante che dipende dall'impaccamento\*

$d_p$  è il diametro medio delle particelle della fase solida\*

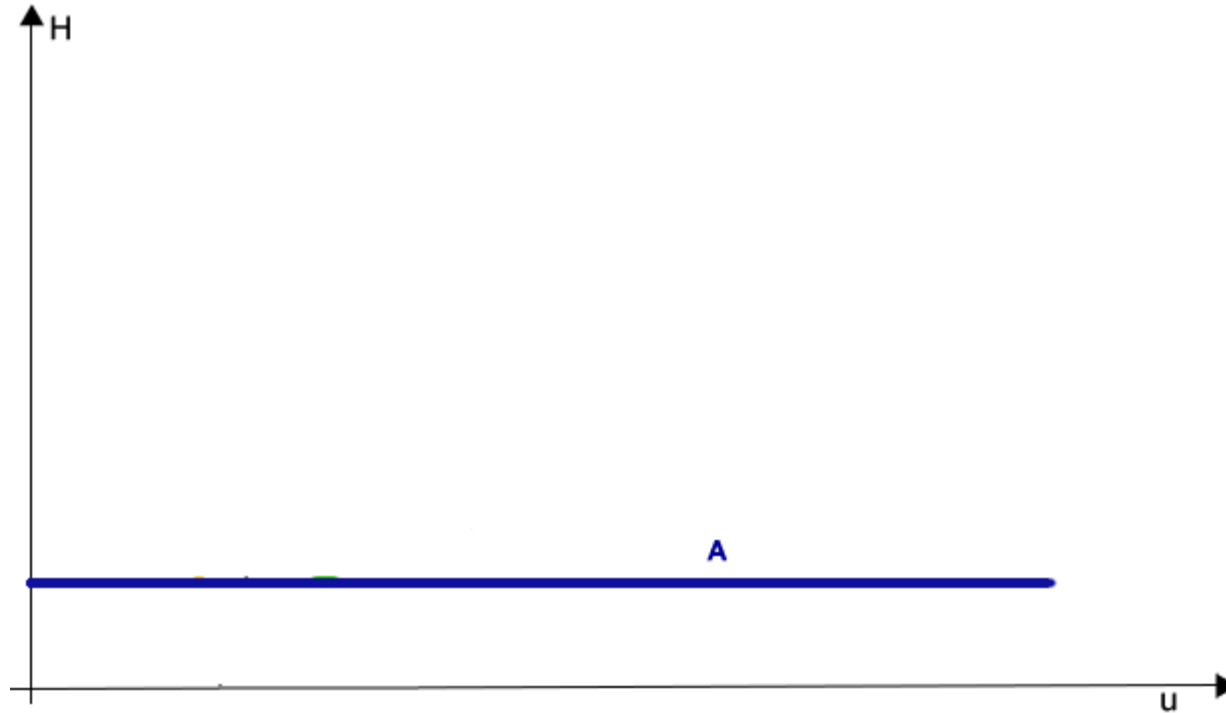
$D_M$  è il coefficiente di diffusione nella fase mobile

Tra i due coefficienti costruttivi\*, quello su cui è più semplice operare per abbassare  $C_M$ , è ridurre il diametro medio delle particelle della fase solida ( $d_p$ ).

Non conviene invece aumentare  $D_M$  poiché esso favorirebbe il termine B



L'equazione di Van Deemter ( $H = A + B/u + C \cdot u$ ) deriva dalla somma dei tre componenti visti prima e si vede come ci sia una zona di flussi più convenienti

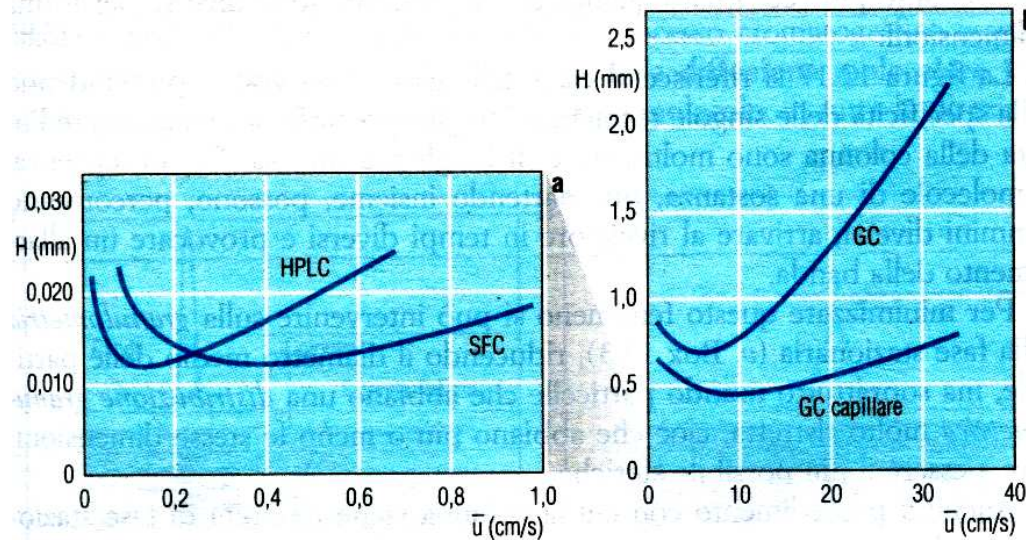


Il valore del flusso viene scelto

- per minimizzare H
- per avere tempi di analisi non troppo lunghi

In base a questa seconda considerazione si sceglie *un flusso un po' più alto* di quello per cui si avrebbe il piatto con altezza minima (  $u = \sqrt{\frac{B}{C}}$  )

L'andamento dell'equazione dipende dal tipo di tecnica perché i contributi dei tre parametri sono differenti.

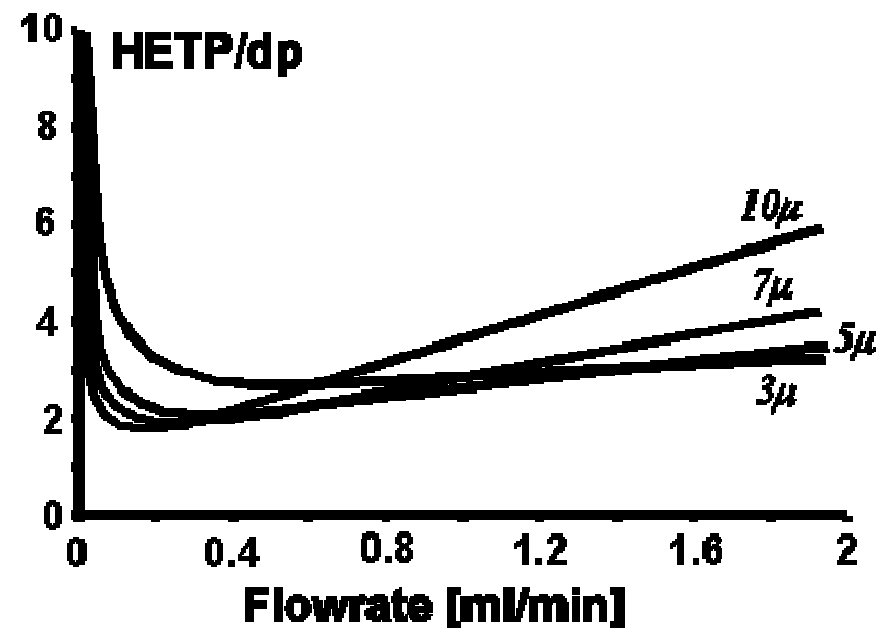


## Altri parametri operativi

### FASE MOBILE

- GASSOSA: va bene ad alta densità per minimizzare B ( $C_M$  è comunque piccola)
- LIQUIDA: va bene ad alta viscosità per minimizzare  $C_M$  (B va sempre bene)

$d_p$  (diametro particelle)  
Tutti i termini della Van Deemter  
suggeriscono dimensioni omogenee e ridotte  
(ma non troppo per problemi di pressione)



## FASE STAZIONARIA LIQUIDA

Deve essere poco viscosa e dare un film sottile

## TEMPERATURA

In genere ha un effetto limitato sull'efficienza ma per essa esiste un valore ottimale calcolabile con una funzione *analog*a alla Van Deemter:

$$H = a + b/T + c \cdot T$$

In ogni caso la variazione è più significativa in GC che in HPLC.

## GEOMETRIA DELLA COLONNA

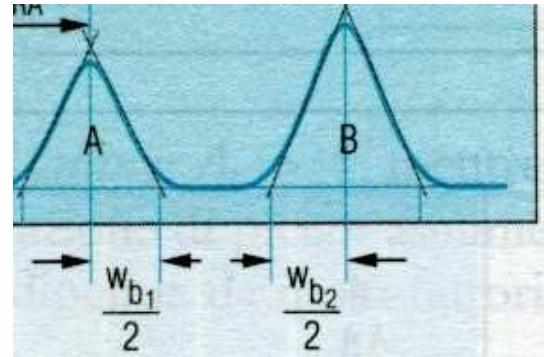
La diminuzione del diametro e l'allungamento della colonna migliorano l'efficienza.

## RISOLUZIONE

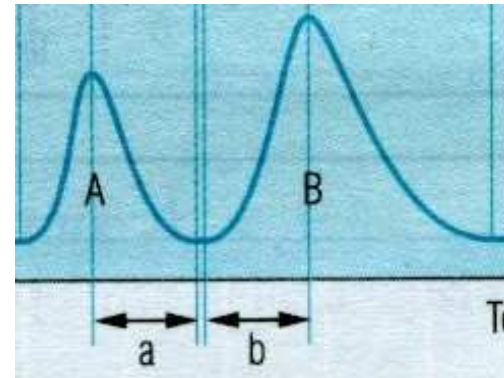
E' l'entità della separazione tra due picchi definita, per due picchi ideali,

o, per

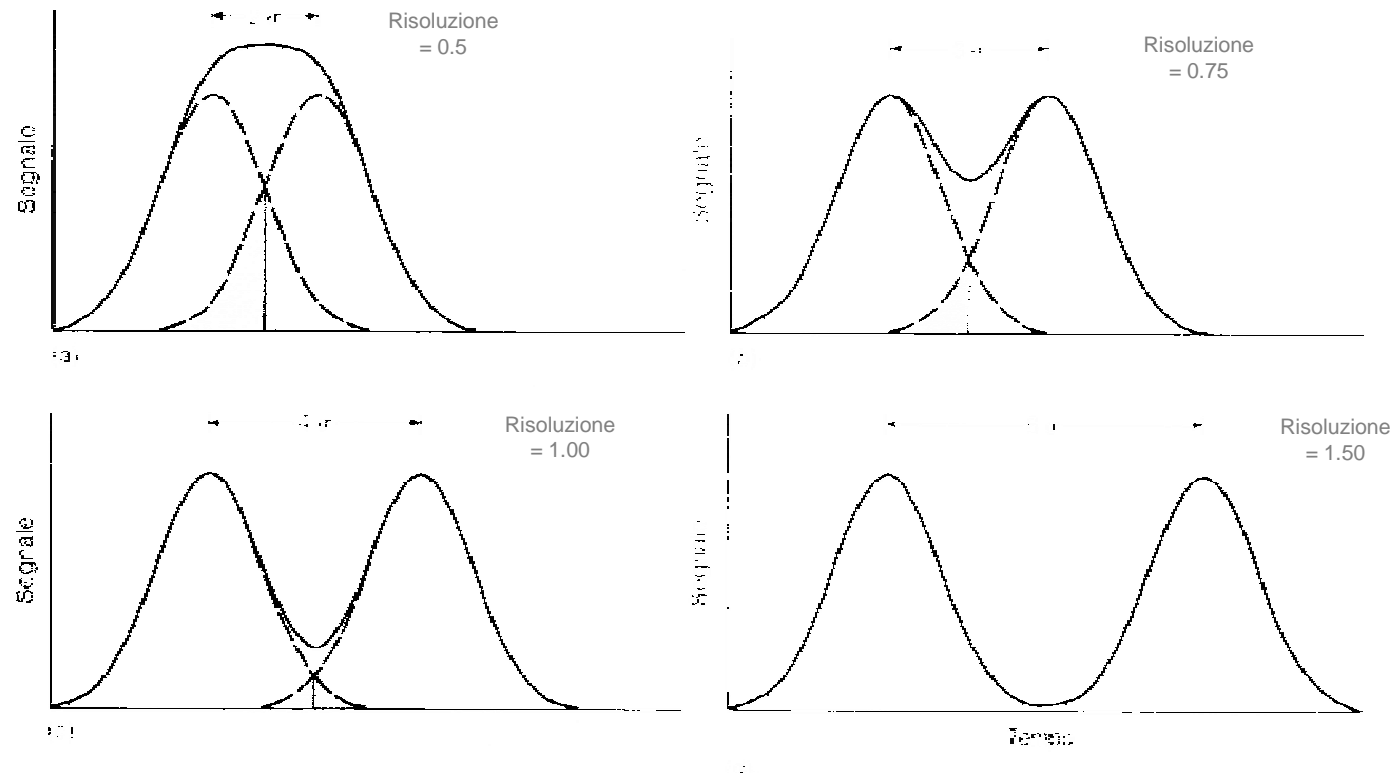
$$R_s = \frac{(t_{R2} - t_{R1})}{2(\sigma_2 + \sigma_1)}$$



$$R_s = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{(a + b)}$$



Come si vede, se  $R_s$  è superiore a 1,5, i due picchi sono completamente risolti



R dipende in pratica dal numero di piatti teorici della colonna, dai fattori di selettività e di fattori di ritenzione dei due analiti. L'equazione che correla tutti questi parametri è:

**NUMERO  
PIATTI**



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



**FATTORE DI  
SELETTIVITA'**

**FATTORE DI  
RITENZIONE**



Per ottenere un'alta risoluzione, occorre:

- aumentare il numero di piatti teorici, aumentando la lunghezza della colonna, o meglio, riducendo l'altezza del piatto teorico (riducendo la dimensione delle particelle della fase stazionaria).
- scegliere una coppia di fasi che assicurino  $k$  tra 1,5 e 5.
- abbassare la  $T$
- Si può anche lavorare a temperatura programmata (in GC), in gradiente di polarità (in HPLC) o agendo sulla pressione (in SFC)

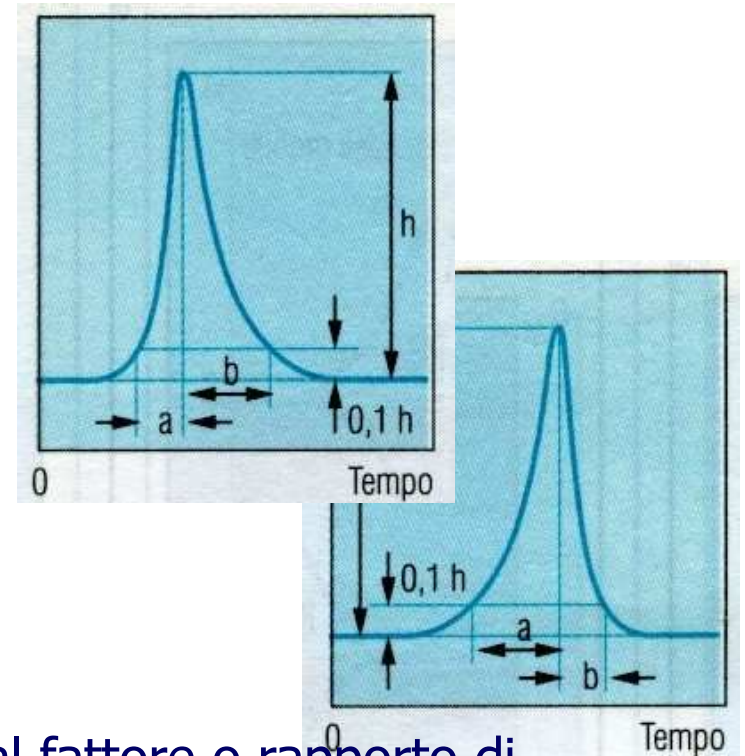


## Asimmetria dei picchi

I picchi cromatografici, in realtà, hanno raramente la forma simmetrica della curva gaussiana. Le deformazioni che spesso si osservano sono di due tipi:

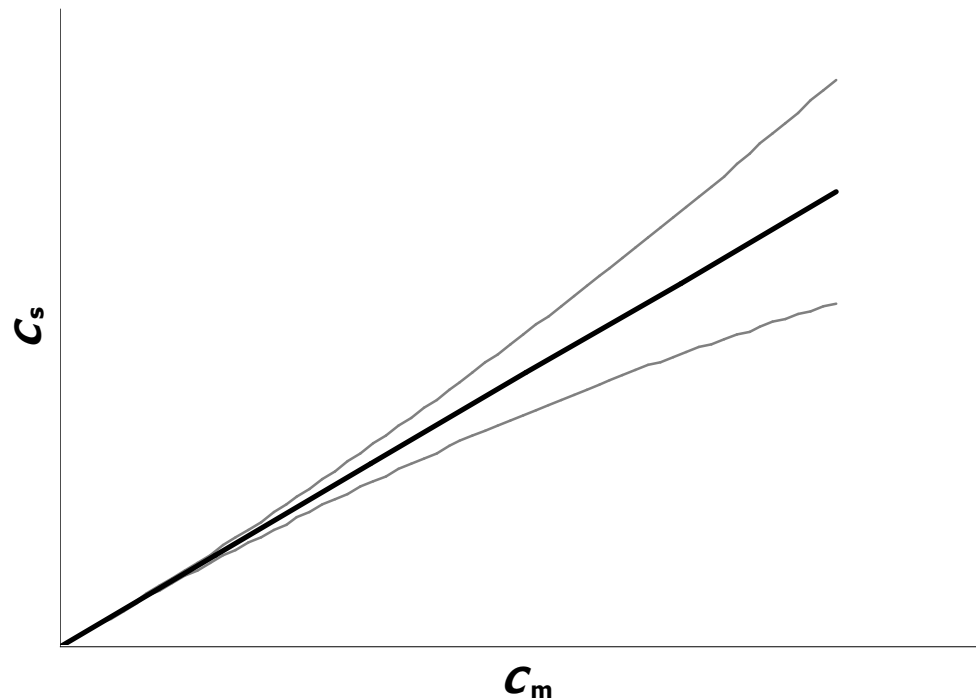
- ***tailing***, quando il tracciato sale bruscamente e raggiunge rapidamente il punto massimo, da cui scende verso la linea di base in modo più lento;
- ***fronting***, quando il tracciato sale lentamente fino al punto di massimo e scende rapidamente verso la linea di base;
- L'asimmetria dei picchi viene espressa dal fattore o rapporto di asimmetria

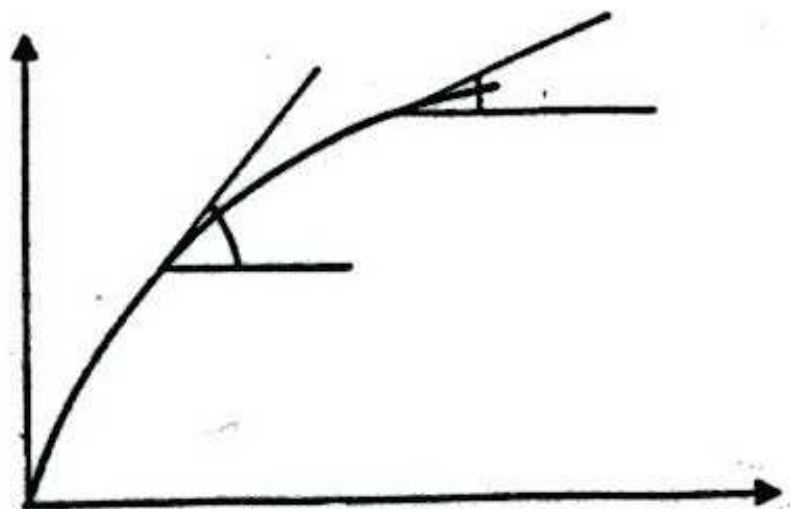
$$A_s = b/a$$



Il coefficiente di distribuzione  $K_d = C_s/C_m$  dovrebbe essere costante e indipendente dalla concentrazione del soluto (isoterma di equilibrio). Se così fosse avremmo bande simmetriche di forma gaussiana.

Nelle colonne reali tuttavia  $K$  cambia all'aumentare della concentrazione del soluto e le bande si presentano codate.

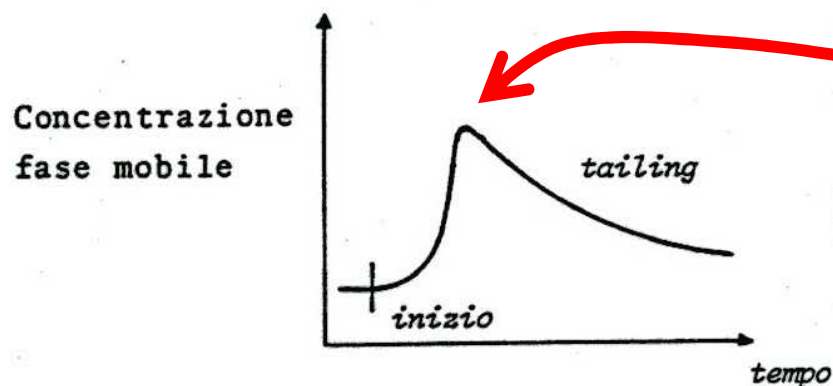
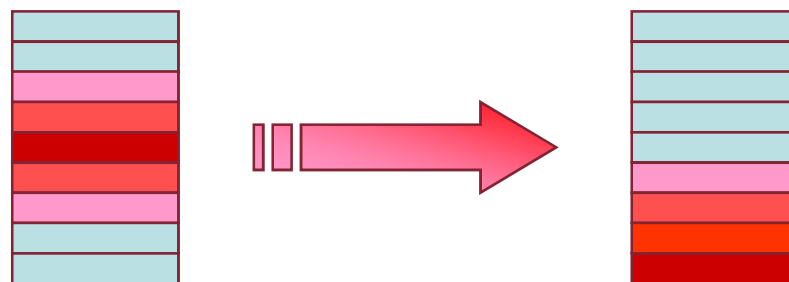




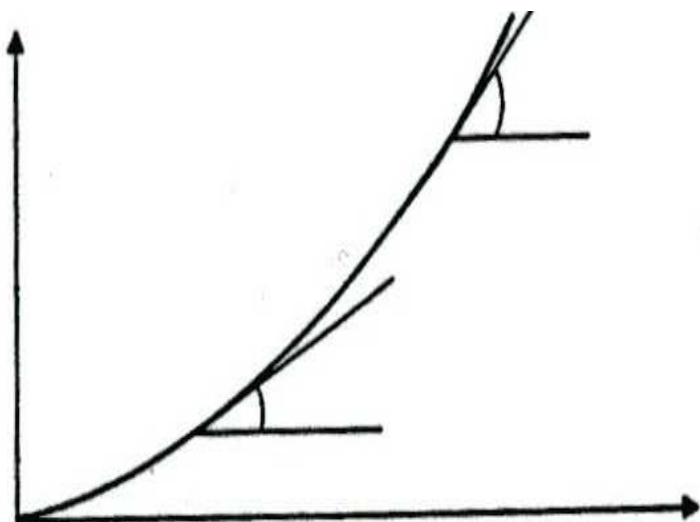
Se l'isoterma della sostanza è convessa (Langmuir), in pratica  $K_d$  diminuisce all'aumentare della concentrazione.

Ciò si verifica quando la fase stazionaria si satura e la sostanza tende a "scappare" con la fase mobile

Partendo da una distribuzione gaussiana la variazione di  $K_d$  farà sì che la zona più concentrata della banda corra di più delle altre.



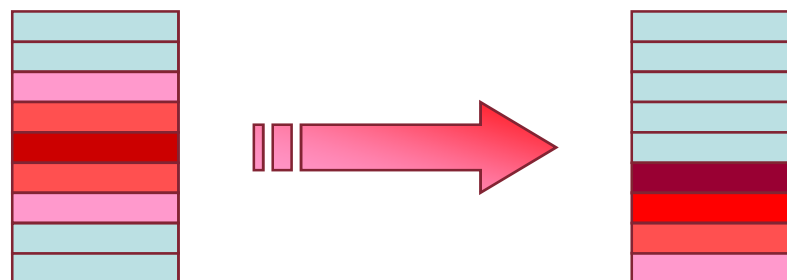
La banda finale in uscita si presenta con un fronte netto con una lunga coda (**tailing**).



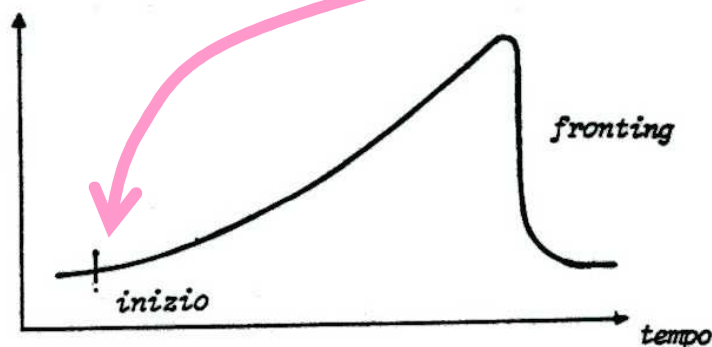
Se l'isoterma della sostanza è concava (anti Languir), in pratica  $K_d$  aumenta all'aumentare della concentrazione.

Ciò si verifica quando la fase mobile si satura e la sostanza non riesce a essere correttamente distaccata via dalla fase stazionaria.

Partendo da una distribuzione gaussiana la variazione di  $K_d$  farà sì che la zona meno concentrata della banda corra di più delle altre.



Concentrazione  
fase mobile



La banda finale in uscita si presenta con un progressivo aumento della concentrazione (**fronting**)