

Tecniche Cromatografiche

Le tecniche cromatografiche sono tecniche separative che accoppiate con un opportuno sistema di rivelazione, hanno permesso di disporre di metodologie idonee per supportare e seguire le varie fasi di sviluppo di un farmaco e assicurarne un uso sicuro.

Le tecniche cromatografiche permettono di separare, identificare e determinare selettivamente i farmaci in matrici semplici (materie prime) o complesse (formulazioni farmaceutiche, prodotti naturali) e l'identificazione e determinazione in fluidi biologici dei prodotti del loro metabolismo (metaboliti).



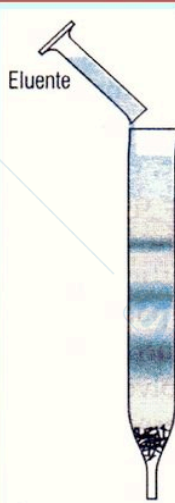
Michail Semenovitch Tswett
(1872-1919),
botanico russo, studioso dei
pigmenti vegetali



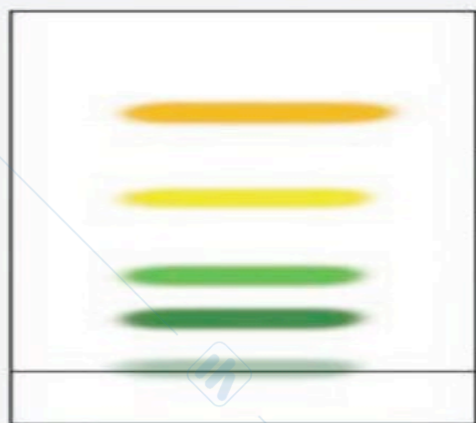
Esperimento
fondamentale



Fase 1: il campione
viene "caricato" in
testa alla colonna

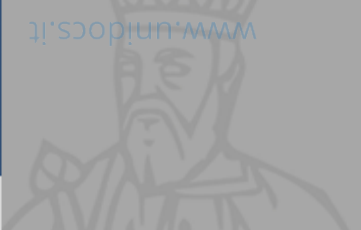


Fase 2: il campione
viene "eluato" nella
colonna finché i
componenti escono
separati



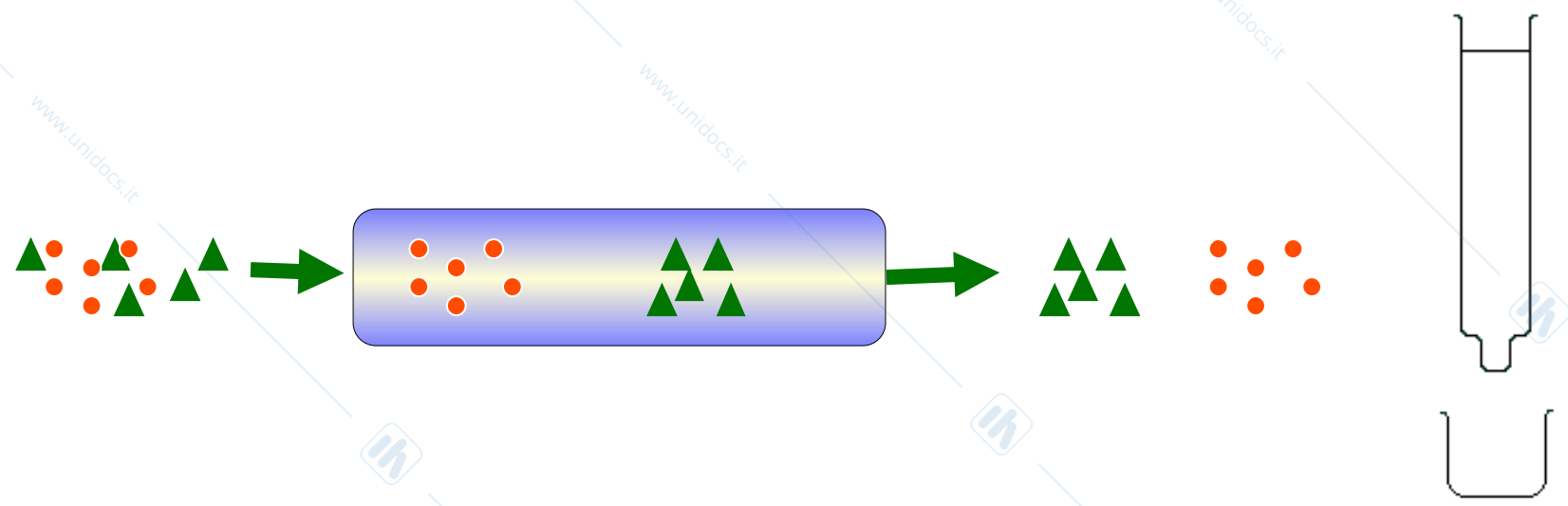
Carotene
Xantofilla
Clorofilla a
Clorofilla b

Nel 1903 Tswett tenne una conferenza sulla separazione dei pigmenti colorati presenti nelle foglie. La separazione era stata ottenuta tramite una colonna di vetro riempita con polvere di gesso (carbonato e solfato di calcio). Il campione era stato posto in testa alla colonna e facendo passare del solvente (etere di petrolio) i componenti si erano separati in zone distinte e colorate lungo la colonna da qui il termine *cromatografia* (scrittura a colori).



La cromatografia e le relative tecniche si sono sviluppate a partire dalla metà del secolo scorso e si basano sulla distribuzione differenziata degli analiti fra due fasi; una chiamata *fase fissa* o *fase stazionaria* e l'altra chiamata *fase mobile* o *eluente* che fluisce in continuo attraverso la fase fissa.

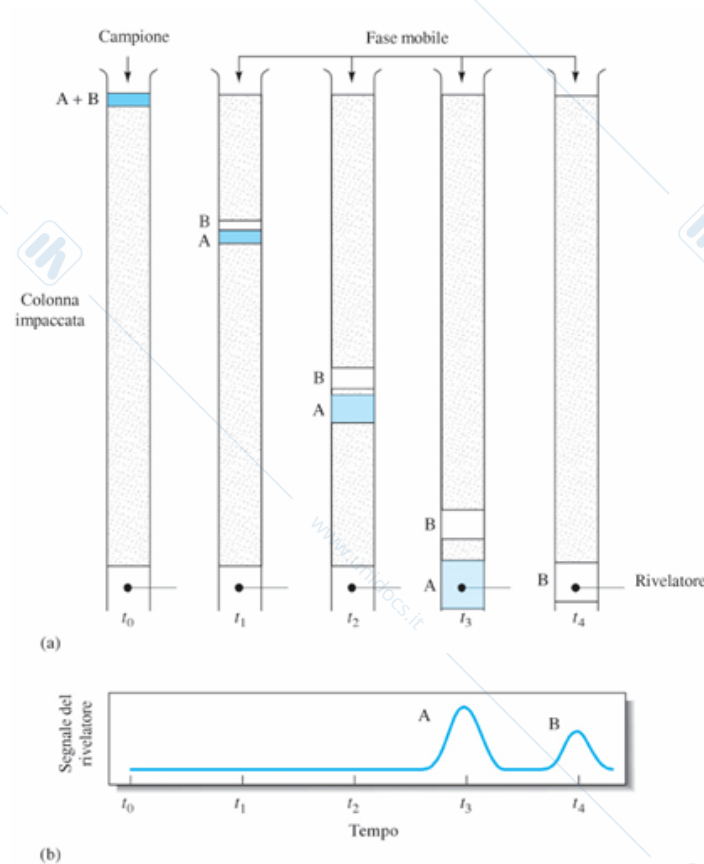
La cromatografia liquida inizialmente è stata impiegata in colonna con flusso a gravità o su carta e solo dal 1960 con lo sviluppo di nuovi materiali cromatografici e con la realizzazione di pompe in grado di garantire un flusso costante della fase mobile attraverso la colonna ha avuto un impiego sempre più crescente.



Le tecniche cromatografiche sono metodi di separazione che in presenza di una fase stazionaria e una fase mobile che si muove in una definita direzione (le due fasi sono a stretto contatto tra di loro):

- *coinvolgono il trasferimento di massa fra la fase mobile e quella stazionaria;*
- *separano i componenti di un campione in base alle differenze nel loro modo di distribuirsi fra le due fasi.*

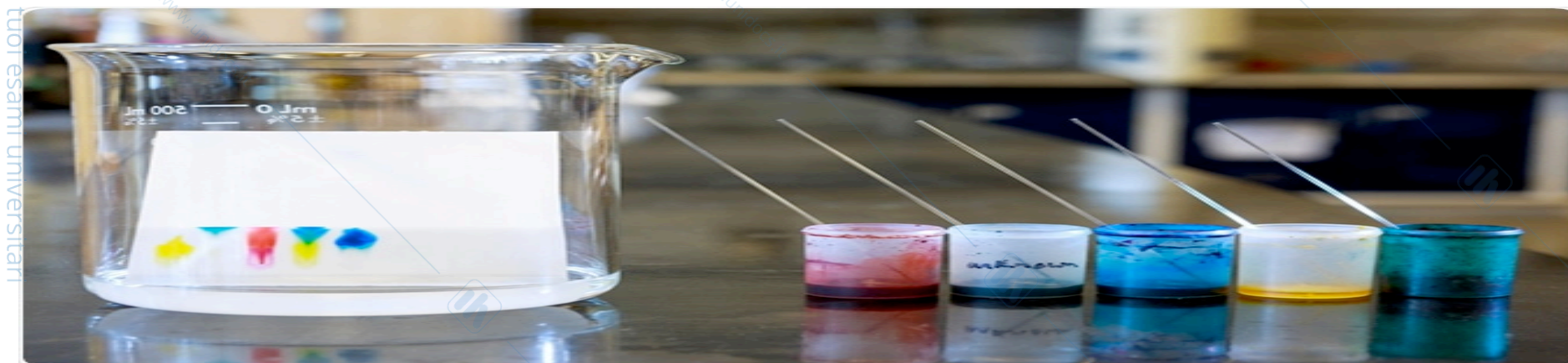
L'insieme di queste due fasi in opportune condizioni sperimentali consente di separare composti aventi diverse proprietà chimico fisiche.

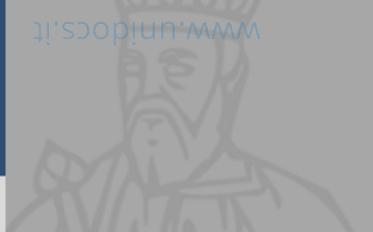


Cromatogramma

In base alla forma del letto cromatografico su cui è realizzato il processo separativo, possiamo distinguere le seguenti varianti:

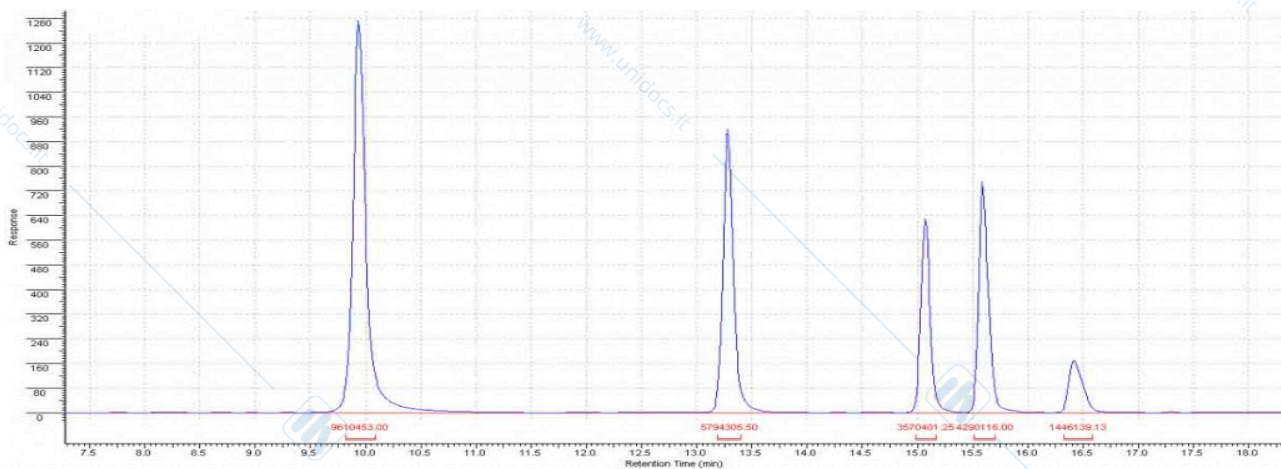
- **Cromatografia su colonna:** la fase stazionaria è contenuta all'interno di una colonna cilindrica, che può riempire completamente (*colonna impaccata*) oppure rivestirne la superficie interna (*colonna tubulare*)
- **Cromatografia planare:** la fase stazionaria è distribuita su una superficie piana,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





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 può essere un solido o un liquido insolubile nella fase mobile.
- **Gas Cromatografia (GC)**: la fase mobile è un gas che funge da carrier per i componenti della miscela e la fase stazionaria può essere un solido o un liquido.
- **Cromatografia supercritica (SFC)**: la fase mobile è un fluido supercritico.

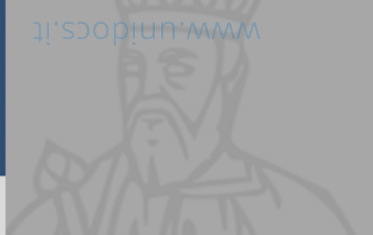




Le interazioni che si verificano tra gli analiti e le due fasi (mobile e stazionaria) riguardano:

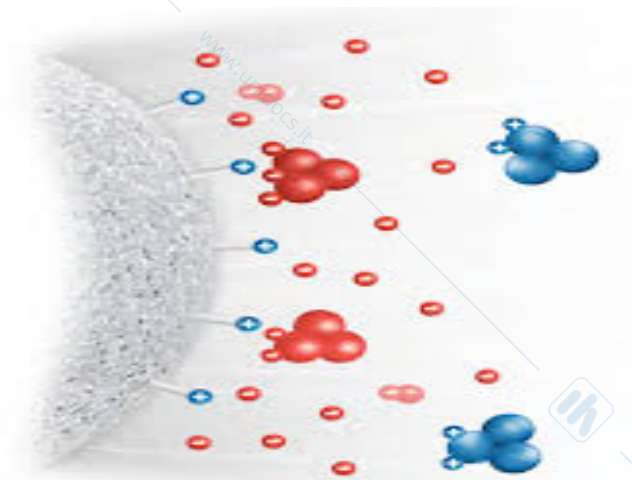
- *legami a idrogeno*
- *interazioni dipolo-dipolo*
- *interazioni dipolo-dipolo indotto*
- *forze di Van der Waals*
- *formazione di composti di interazione*
- *attrazione coulombiana*
- *interazioni steriche*

In tutte queste interazioni svolge un ruolo fondamentale la polarità delle due fasi. Spesso possono però essere presenti più tipi di interazione nello stesso processo cromatografico.



In base ai tipi di interazione chimico-fisica che controlla la distribuzione del soluto i meccanismi di separazione impiegati in cromatografia si dividono in:

- adsorbimento
- ripartizione
- scambio ionico
- esclusione
- affinità

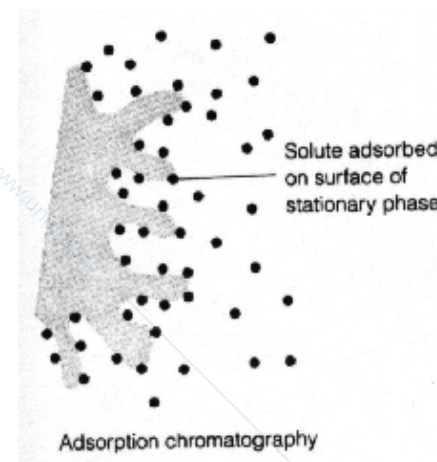


Cromatografia di adsorbimento

La fase stazionaria è solida ed è costituita da particelle di materiale adsorbente (silice, allumina, etc.); sulla superficie del materiale 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.

Il meccanismo coinvolto prevede una competizione fra le molecole dell'analita e della fase mobile per i siti adsorbenti polari della fase stazionaria e il processo cromatografico comporta una successione di fasi di adsorbimento e di desorbimento. I soluti si muovono con diversa velocità e si possono separare sulla base della diversa affinità per i siti dell'adsorbente: i composti polari sono più trattenuti rispetto agli apolari.

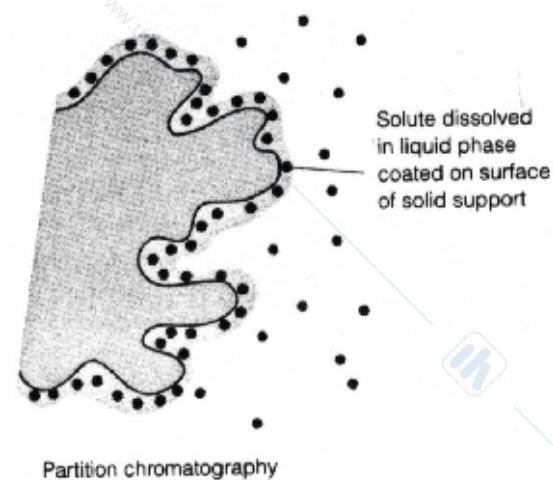
Permette di analizzare analiti organici e inorganici.



Cromatografia di Ripartizione

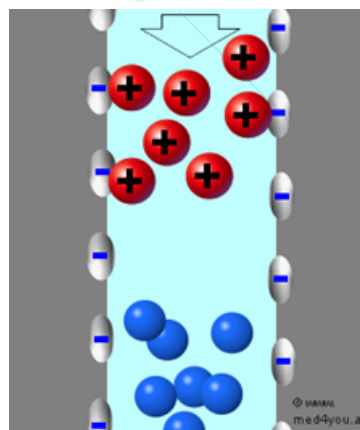
La fase stazionaria è un liquido che impregna un solido granulare inerte o è a esso chimicamente legato attraverso la funzionalizzazione della silice con gruppi funzionali organici; la separazione degli analiti è controllata dalla loro relativa ripartizione fra le due fasi liquide (stazionaria e mobile). Durante l'eluizione le molecole si ripartiscono dinamicamente tra le due fasi (fra loro immiscibili) secondo la diversa solubilità di ognuna. Si parla quindi di *cromatografia di ripartizione*, che può essere *gas-liquido* o *liquido-liquido* a seconda della natura della fase mobile.

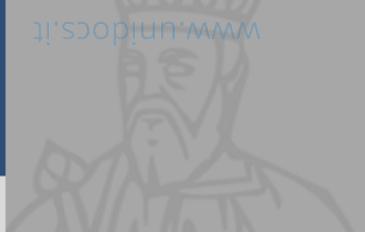
La cromatografia di ripartizione è chiamata in *fase normale* se la fase stazionaria è più polare della fase mobile costituita da miscele di solventi organici come esano, cloroformio, alcool isopropilico. Se la fase stazionaria è meno polare della fase mobile si parla di *fase inversa* in quanto *sono più trattenuti gli analiti lipofili*. La fase mobile è relativamente polare e costituita da miscele di acqua o tamponi acquosi con metanolo o acetonitrile). Si tratta della tecnica più comunemente impiegata per la separazione di sostanze organiche.



Cromatografia di scambio ionico

La fase stazionaria è costituita da un polimero inerte insolubile contenente gruppi funzionali ionizzati o ionizzabili. I gruppi funzionali sono acidi o basici e i 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). Si usa per la separazione di sostanze ioniche o ionizzabili e giocano un ruolo importante il pH e la forza ionica della fase mobile. E' usata per separare analiti ionici o ionizzabili a un opportuno pH.



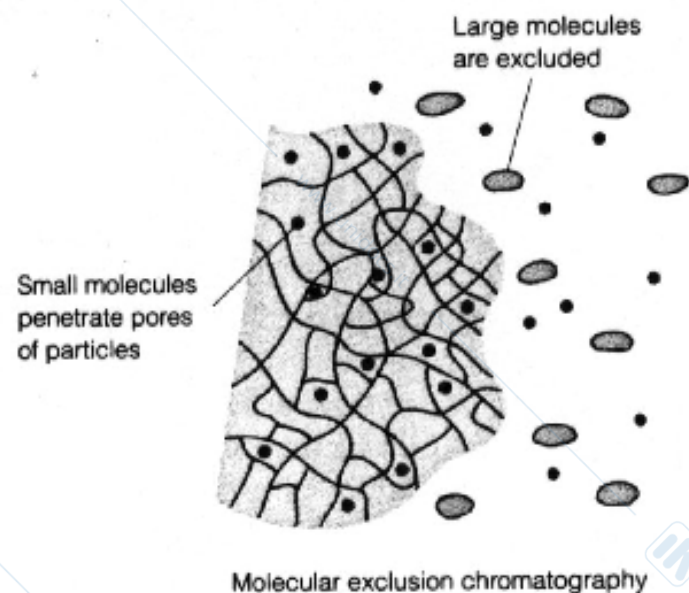


Cromatografia di esclusione dimensionale

La fase stazionaria è un solido poroso o un gel. Le molecole dell'analita, solubilizzate 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 e si muovono nella fase mobile interstiziale uscendo dalla colonna in tempi brevi.

Si parla di *cromatografia di esclusione dimensionale* (SEC) con le varianti *Gel permeazione* per la separazione di sostanze insolubili in acqua e *Gel filtrazione* per la separazione di sostanze solubili in acqua.

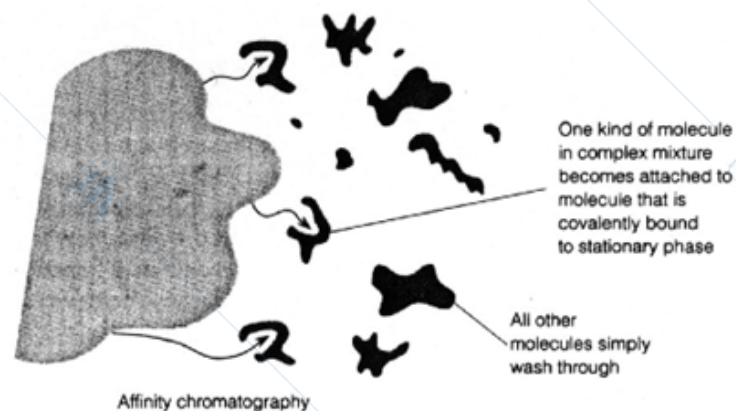
La tecnica è impiegata per la separazione di molecole di grandi dimensioni.



Cromatografia di affinità

La fase stazionaria è un solido con siti molecolari di ricognizione immobilizzati e il meccanismo di separazione è basato sulla specificità tridimensionale dell'interazione fra il sito di riconoscimento molecolare e l'analita. In questo caso si utilizzano reazioni di tipo biochimico, reversibili e molto specifiche. Si usa nella separazione delle biomolecole, sfruttando ad esempio il legame selettivo tra un enzima e il suo substrato, tra ormoni e recettori, o tra antigeni e anticorpi.

Le molecole da separare interagiscono con la fase stazionaria e si ha l'eluizione selettiva di alcuni componenti della miscela. Si parla di *cromatografia di affinità* (AFC) ed è impiegata nella separazione di molecole di interesse prevalentemente biochimico.



Un ligando specifico per la molecola di interesse è legato covalentemente ad una matrice insolubile. E' necessario che le molecole da isolare siano in grado di legarsi al ligando in maniera specifica e reversibile.



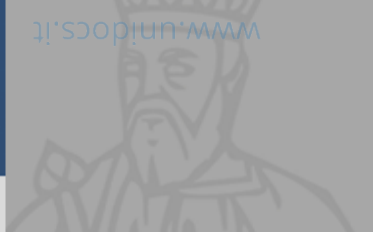
Le separazioni cromatografiche sono comunque il risultato di un meccanismo principale al quale si sovrappongono effetti secondari. Questi effetti possono favorire o ostacolare la separazione. Ad esempio nella cromatografia di ripartizione i supporti di silice possono dare effetti sfavorevoli di adsorbimento.

- In base alla forma del letto cromatografico
 - *Cromatografia su colonna (impaccata, open-tubular)*
 - *Cromatografia planare (su carta, su strato sottile)*
- In base allo stato fisico della fase mobile
 - *Cromatografia Liquida (LC)*
 - *Gas Cromatografia (GC)*
 - *Cromatografia in fase supercritica (SFC)*
- In base al meccanismo di separazione
 - *Adsorbimento*
 - *Ripartizione*
 - *Scambio ionico*
 - *Esclusione*
 - *Affinità*

Il processo cromatografico

- il campione è introdotto nella fase mobile;
- la fase mobile viene fatta eluire in continuo attraverso la fase stazionaria;
- la fase stazionaria (liquida o solida) si trova all'interno di una *colonna* oppure è supportata su una *superficie piana*;
- la fase mobile e la fase stazionaria sono scelte in modo che i componenti della miscela da separare si distribuiscano tra le due fasi:
 - i componenti più affini alla fase stazionaria passeranno più tempo in questa fase, quindi si sposteranno più lentamente attraverso il sistema;
 - i componenti più affini alla fase mobile si sposteranno invece più velocemente;
- la separazione dei componenti avviene in quanto ogni sostanza ha una distribuzione caratteristica tra le due fasi (costante di distribuzione $K=C_s/C_m$)

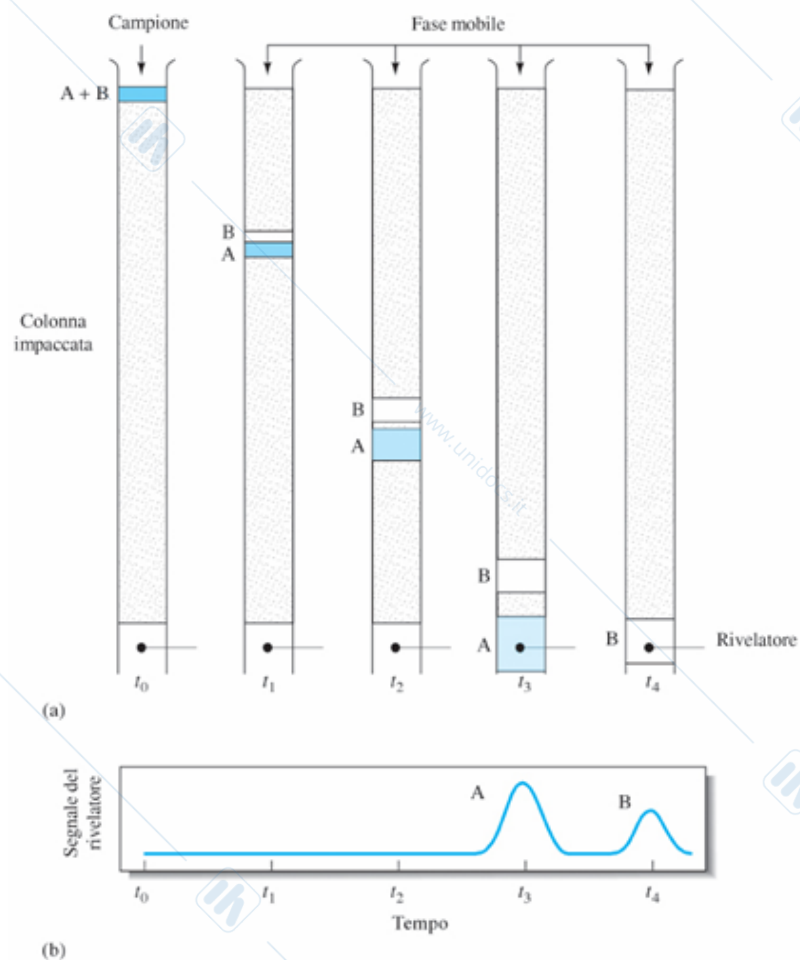


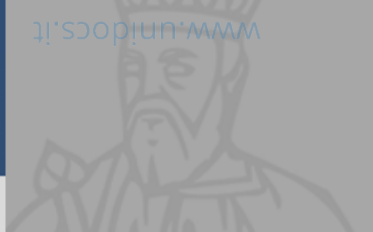


Cromatografia su Colonna: Cromatogramma

All'uscita della colonna è presente un rivelatore che misura il segnale dell'*eluato* (cioè della fase mobile che esce dalla colonna). Riportando il segnale in funzione del tempo si può ottenere un *cromatogramma*

L'altezza o l'area sottesa dai picchi sono utilizzati come variabili risposta per i metodi di calibrazione.





Il comportamento di un soluto in un dato sistema cromatografico è descritto da opportuni parametri che rendono possibile il confronto fra vari soluti, la loro identificazione e anche la verifica della validità del sistema cromatografico.

Se abbiamo un soluto depositato su una colonna esso, per effetto della fase mobile, fluirà verso il basso con una velocità costante espressa in ml/min (portata) o cm/s (velocità lineare).

Si possono verificare le seguenti situazioni:

a) Il soluto ha affinità per la fase stazionaria così forte da non interagire con la fase mobile e sarà trattenuto in modo permanente dalla fase stazionaria.

b) Il soluto non interagisce con la fase stazionaria e permane solo nella fase mobile. Il soluto sarà eluito dalla colonna dopo un tempo t_0 con un consumo di fase mobile pari a $V_0 = ut_0$, dove u è la velocità della fase mobile. V_0 dipende dalla lunghezza della colonna ed è detto volume morto. Esso rappresenta il volume della fase mobile che si trova negli spazi interstiziali fra le particelle di materiale impaccato dalla colonna.

c) Il soluto interagisce con la fase stazionaria e è sottoposto a successive ripartizioni fra la fase mobile e la fase stazionaria nel suo percorso attraverso la colonna. Il soluto sarà ritenuto lungo la colonna e si muoverà con una velocità v che sarà inferiore alla velocità u della fase mobile.

Il processo cromatografico

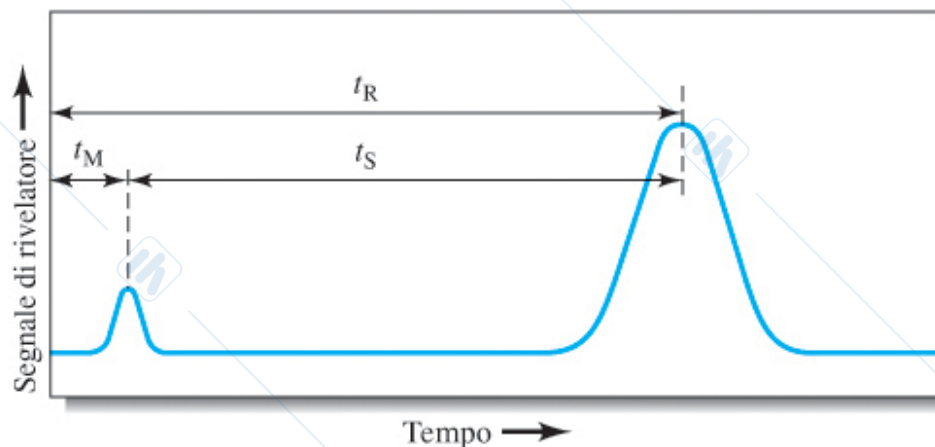
- La vera condizione cromatografica si realizza quando il soluto interagisce con la fase stazionaria ed è sottoposto a successive ripartizioni fra le due fasi mobile e stazionaria nel percorso attraverso la colonna. Il soluto viene quindi ritenuto lungo la colonna e si muoverà con velocità v che sarà inferiore alla velocità u della fase mobile. Tale velocità detta di flusso dipende dalle dimensioni della colonna (diametro interno, lunghezza), dalle caratteristiche fisiche delle particelle che compongono la fase stazionaria (dimensioni, forma, porosità) e dalla viscosità della fase mobile.
- Siccome il soluto si muove solo quando si trova nella fase mobile, la velocità v dipenderà dal modo il cui il soluto si distribuisce tra le due fasi:

$$v = \frac{q_m}{q_m + q_s} u$$

Dove q_m e q_s sono la quantità di soluto nella fase mobile e stazionaria

- La velocità v è quindi una frazione della velocità di flusso e il soluto uscirà dalla colonna dopo un tempo, superiore al tempo che impiega l'eluente a percorrere la colonna e indicato con t_0 , chiamato tempo di ritenzione (t_r).

Tempo di ritenzione

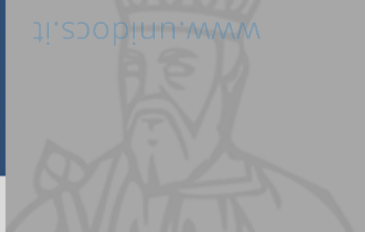


$$t_r = \frac{L}{v}$$

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.

t_M è il tempo che impiega la fase mobile ad uscire dalla colonna

- il picco a sinistra rappresenta un soluto che non ha alcuna interazione con la fase stazionaria
- il picco a destra rappresenta un soluto che ha, invece, interazione con la fase stazionaria



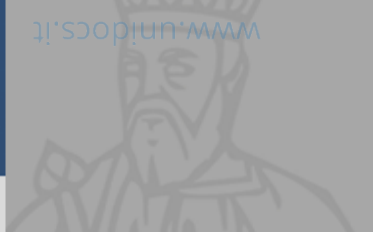
Il differente tempo di ritenzione comporta un differente consumo di fase mobile $V_r = ut_r$ detto volume di ritenzione che sarà maggiore del volume V_0 perché oltre a contenere V_0 deve comprendere il volume di fase mobile necessario per superare le interazioni fra soluto e fase stazionaria.

$$t_r = t_0 \left(1 + \frac{q_s}{q_m}\right) \quad \text{dove} \quad \frac{q_s}{q_m} = k' \quad \text{fattore di capacità}$$

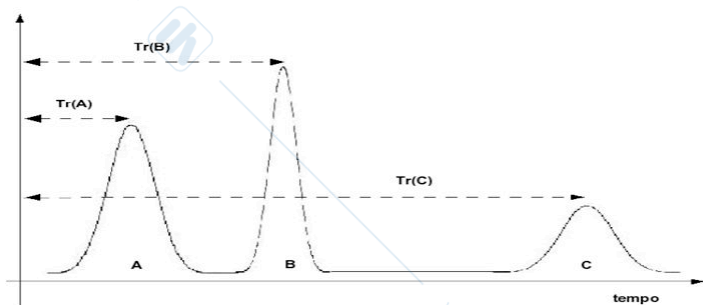
$$t_r = t_0(1 + k') = t_0 + k't_0$$

- Pertanto:

$$k' = \frac{t_r - t_0}{t_0}$$



Il **fattore di capacità** può quindi essere ricavato direttamente dai dati di un cromatogramma (grafico nel quale il segnale del rilevatore è riportato in funzione del tempo). Il profilo di concentrazione per ogni soluto che esce dalla colonna ha la forma del picco, il tempo al quale esce il massimo del picco costituisce il tempo di ritenzione t_r di quel soluto.

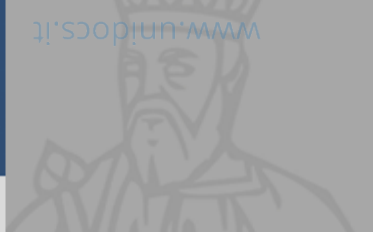


$$k' = \frac{t_r - t_0}{t_0}$$

La quantità di soluto nella fase stazionaria q_s e nella fase mobile q_m possono essere espresse come il prodotto della concentrazione per i volumi.

Il fattore di capacità sarà:

$$k' = \frac{q_s}{q_m} = \frac{c_s}{c_m} \times \frac{V_s}{V_m}$$



Quando la distribuzione del soluto tra le due fasi (stazionaria e mobile) avviene sempre allo stesso modo, il rapporto C_s/C_m è costante e mettendo in relazione C_s con C_m si ottiene una retta detta **isoterma lineare di distribuzione** che ha equazione:

$$C_s = K C_m$$

$$K = \frac{C_s}{C_m}$$

k è detto **coefficiente di distribuzione**

$$k' = K \frac{V_s}{V_m}$$

L'espressione mette in relazione il fattore di capacità k' , un parametro cromatografico che descrive la ritenzione del soluto, con un parametro termodinamico (coefficiente di distribuzione K) legato alla natura del soluto e con il rapporto delle fasi V_s/V_m che è caratteristico della colonna usata.

K per una data fase stazionaria dipende dalla composizione della fase mobile. In gas cromatografia è la natura della fase stazionaria a giocare un ruolo predominante.

Se due composti A e B hanno diversi coefficienti di distribuzione K_a e K_b , avranno quindi anche diversi fattori di capacità k'_a e k'_b e quindi diversi tempi di ritenzione. Si può quindi presumere che quel determinato sistema cromatografico sia capace di separare i due composti A e B. Questo è lo scopo della cromatografia e per realizzarlo occorre avere differenti coefficienti di distribuzione per i singoli componenti della miscela. Questa capacità è definita selettività o fattore di separazione di un sistema cromatografico e per una coppia di analiti A e B è data da:

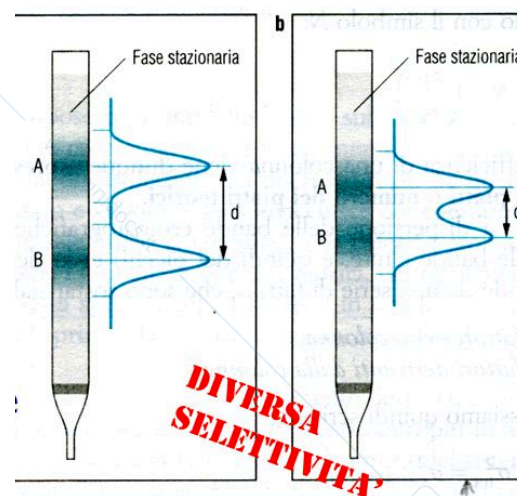
$$\alpha = \frac{t_A}{t_B}$$

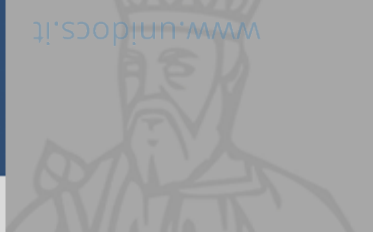
$$\alpha = \frac{K_A}{K_B}$$

Quindi perché A e B si separino occorre come punto di partenza che:

$$K_A \neq K_B$$

$$\alpha \neq 1$$

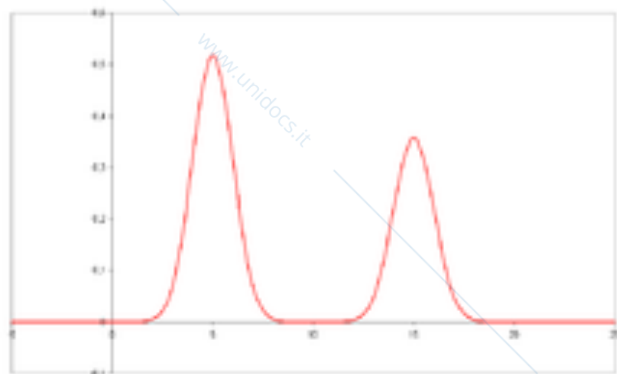




Il processo cromatografico può essere approssimato ad una successione di equilibri che si realizzano entro distinti e successivi stadi (piatti) all'interno della colonna.

La colonna può essere considerata una sovrapposizione di unità (piatti teorici) contenenti tutte le stesse proporzioni di fase mobile e di fase stazionaria entro la quale il soluto si distribuisce in condizioni di equilibrio secondo il suo coefficiente di distribuzione $K=C_s/C_m$

Assumendo che K sia costante, si evidenzia che l'analita si muove nella colonna, distribuendosi in una banda che presenta una distribuzione gaussiana e descrive la distribuzione del soluto nei vari piatti per il passaggio di n volumi di fase mobile.



La funzione gaussiana consente di ottenere il profilo di concentrazione di un'analita mentre si muove nella colonna cromatografica e quindi descrive anche il profilo di concentrazione mentre l'analita esce dalla colonna.

Efficienza è la capacità della colonna di minimizzare la dispersione del soluto per mantenerlo in una zona cromatografica stretta in modo che l'ampiezza del picco di eluizione sia minima.

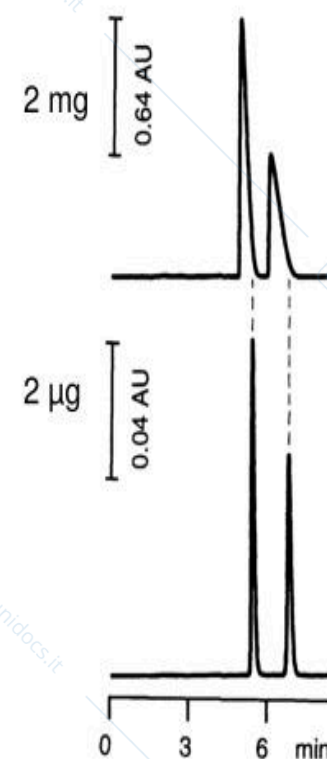
Ogni soluto passa attraverso lo stesso numero di piatti totali della colonna indicato con N ma richiede un volume diverso di eluente per uscire dalla colonna.

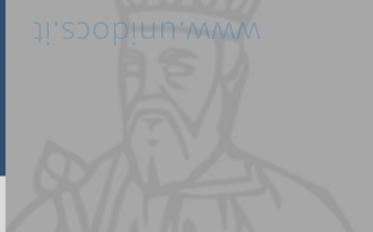
Una colonna efficiente fornisce picchi stretti e quindi crea le condizioni favorevoli per realizzare delle separazioni.

In alcuni casi il picco risulta asimmetrico, mostrando un allargamento sia della parte iniziale sia della parte finale (tailing).

L'asimmetria dei picchi può essere dovuta a numerosi fattori:

- caricamento in colonna di concentrazioni troppo elevate di analita;
- imperfetto impaccamento della colonna;
- presenza di Interazioni soluto-supporto.





L'efficienza costituisce una delle condizioni perché una colonna possa dare buone separazioni cromatografiche. Si esprime in termini di piatti teorici (N) della colonna e è definita da: $N=(t_r/\sigma)^2$

σ è la distanza tra i due punti di flesso della gaussiana mentre w è l'ampiezza della linea di base e è pari a 4σ

Abbiamo quindi che $N=16(t_r/w)^2$

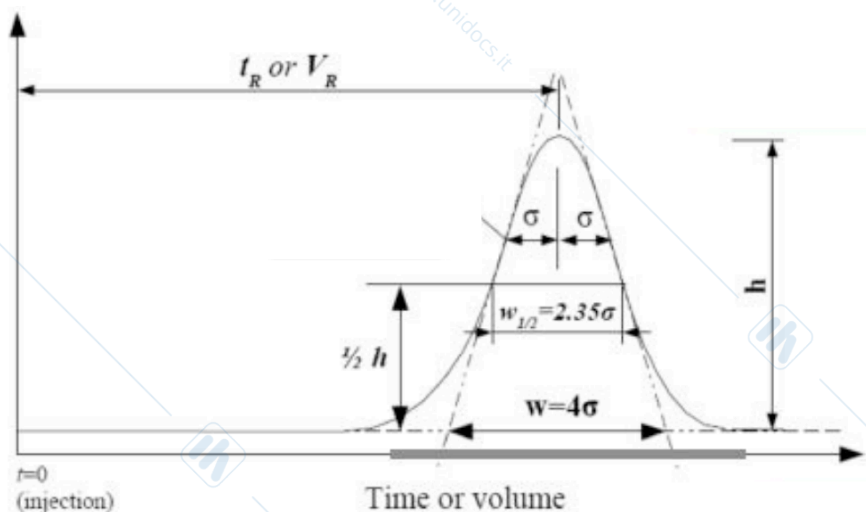
Possiamo quindi calcolare i piatti teorici N misurando i seguenti parametri del cromatogramma:

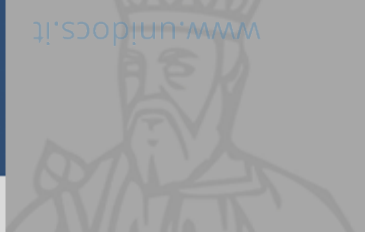
t_r = tempo di ritenzione (tempo al quale esce il massimo del picco)

w = base del triangolo costruito sul picco

Quando i picchi non sono simmetrici è più conveniente utilizzare l'ampiezza del picco a metà altezza ($w_{0,5}$); siccome $w_{0,5} = 2,345\sigma$

$$N = 5,54 (t_r/w_{0,5})^2$$



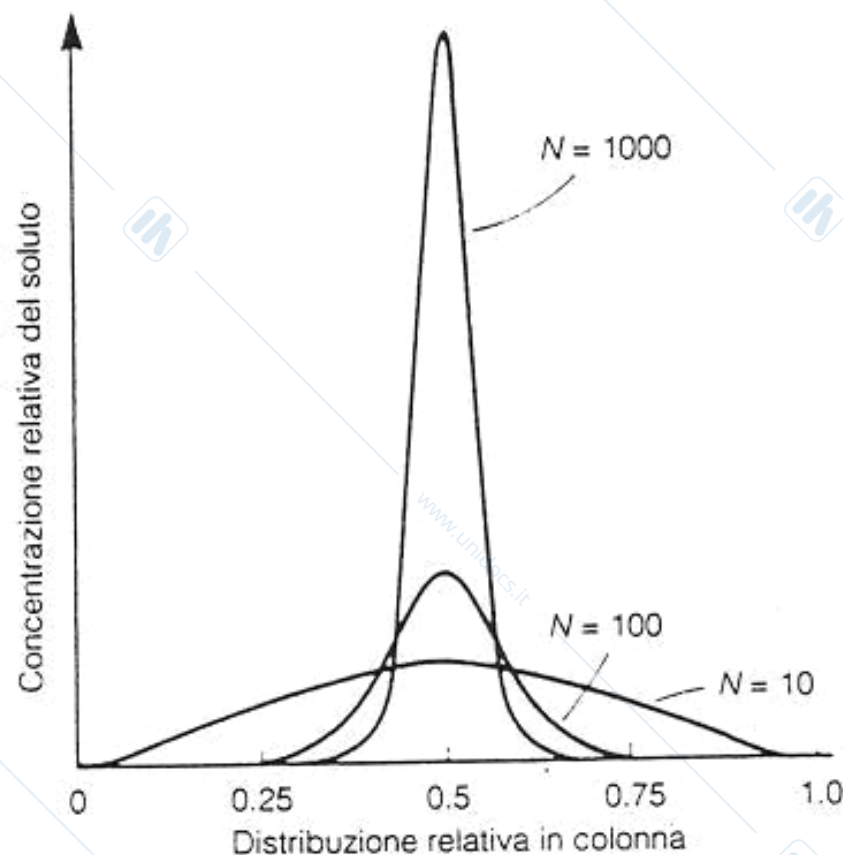


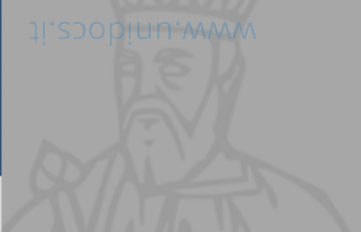
E' possibile calcolare anche l'altezza di un piatto di una colonna e questa è pari a :

$$H=L/N$$

Mentre N è adimensionale H è normalmente espresso in mm.

Più è piccolo H e più la colonna è efficiente. In Cromatografia liquida buoni valori di N sono pari a 50000 e di H pari a 0,02 mm.





Il fine di un'analisi cromatografica è la separazione di due o più componenti. Perché due molecole si separano?

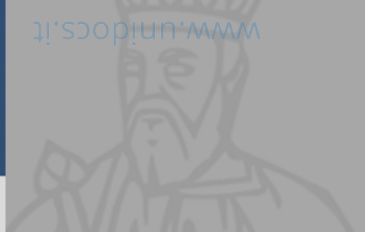
Perché l'interazione e/o l'accessibilità della molecola A con le due fasi (stazionaria e mobile) sono diverse rispetto a quelle della molecola B.

Il grado di separazione è espresso dalla risoluzione. Due picchi sono risolti quando non è presente alcuna sovrapposizione tra di loro.

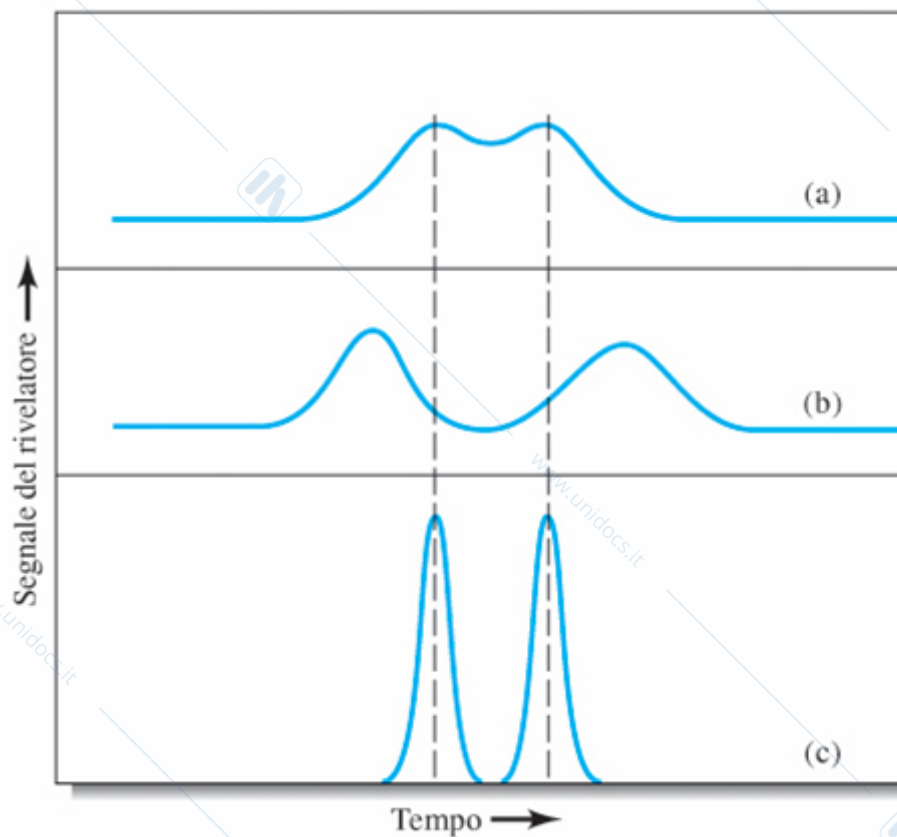
La **risoluzione** tiene conto della differenza dei tempi di ritenzione dei due composti e dell'ampiezza dei picchi.

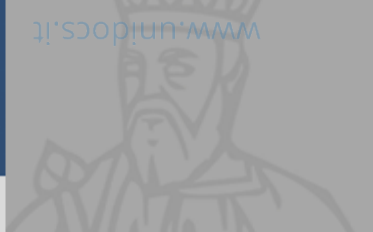
$$R_s = \frac{2\Delta t_r}{w_1 + w_2}$$

Quando R_s è pari a 1, la differenza tra i tempi di ritenzione è uguale all'ampiezza della base e si ha ancora sovrapposizione, si considerano risolti due picchi quando $R_s=1,5$.



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

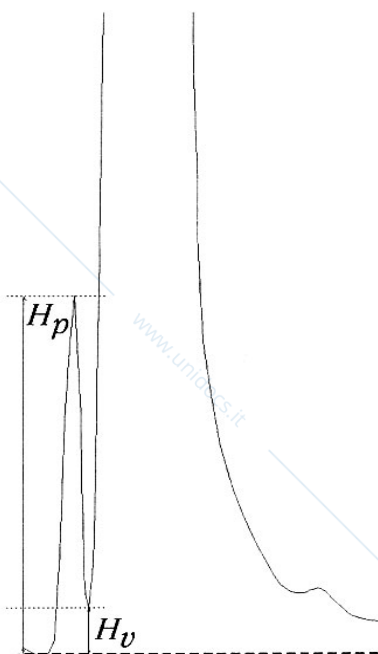




Oltre alla risoluzione può essere usato il Rapporto picco-valle.

Questo è utile quando la separazione non è completa a causa di differenti livelli di concentrazione dell'analita e può essere calcolata dall'espressione:

$$p/v = h_p/h_v$$

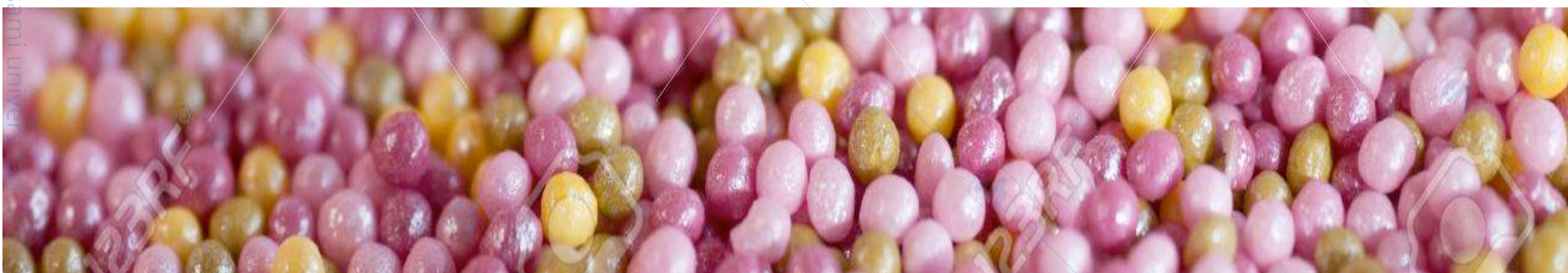


E' molto importante ottenere picchi stretti per avere un'ottima separazione e quindi l'efficienza della colonna è importante così come la selettività. Questi effetti possono essere integrati in un'unica espressione generale che lega la risoluzione all'efficienza della colonna e permette di trovare le migliori condizioni sperimentali per l'analisi.

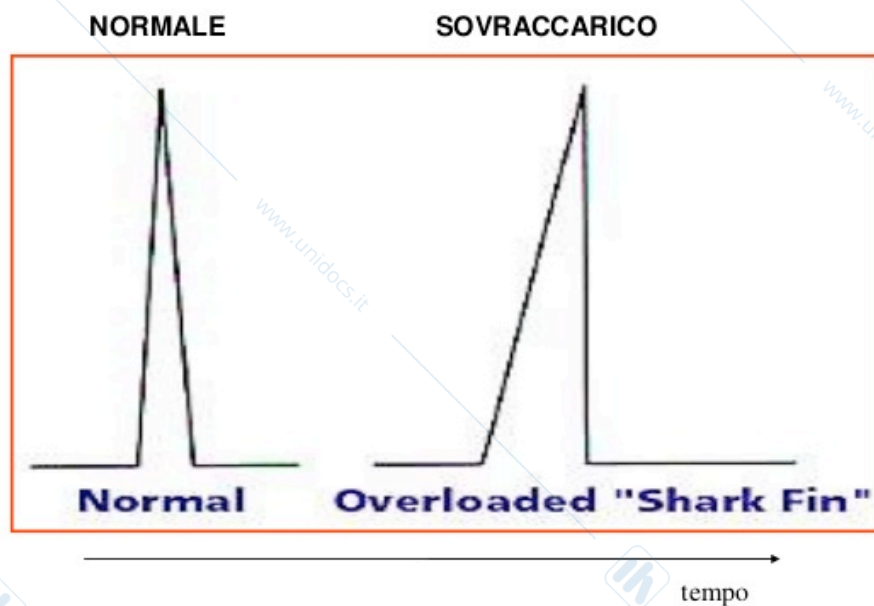
$$R_s = \frac{1}{4} \sqrt{N} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k'}{k' + 1} \right)$$

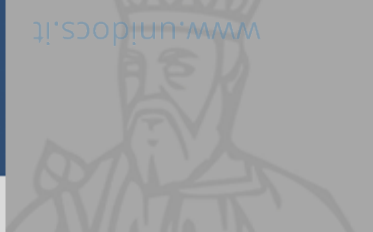
$$\alpha = \frac{K_A}{K_B}$$

Per ottenere un aumento della selettività occorre modificare K (coefficiente di distribuzione) e questo si ottiene cambiando la composizione e il pH della fase mobile.



Per ottenere una risposta dal rilevatore anche per componenti presenti in tracce (impurezze di un farmaco) può essere necessario introdurre nella colonna una quantità elevata di campione. Tuttavia esiste una quantità massima di campione che la colonna può ricevere senza compromissione delle sue prestazioni. Questa caratteristica si chiama capacità della fase stazionaria che, avendo un numero di siti attivi "finito", potrà interagire con un numero finito di molecole di soluto. In caso di sovraccarico della colonna si osserva un allargamento del segnale e tempi di ritenzioni più corti.





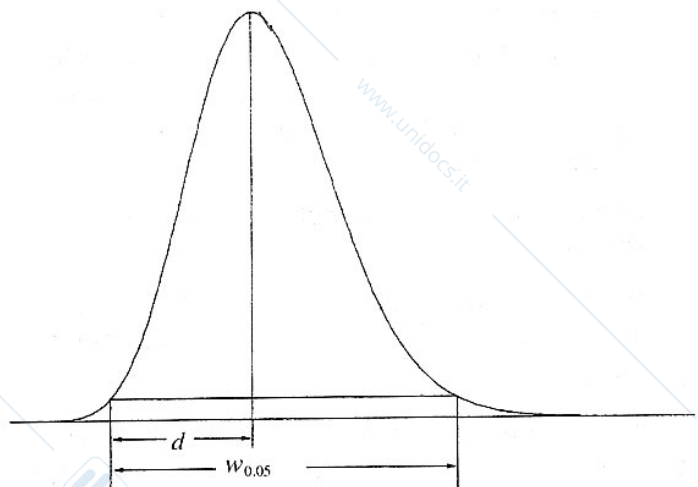
Il **Fattore di simmetria (A_s)** è calcolato dall'espressione:

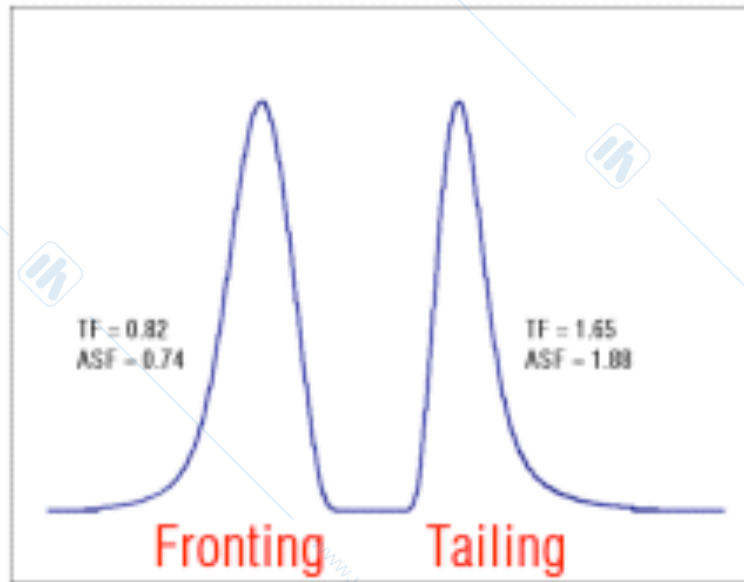
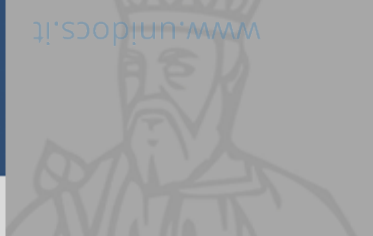
$$A_s = w_{0.05}/2d$$

$w_{0.05}$ = larghezza del picco ad un ventesimo dell'altezza del picco

d = distanza tra la perpendicolare del massimo del picco e il lato esterno del picco ad un ventesimo dell'altezza del picco.

Un valore di 1 significa simmetria ideale.



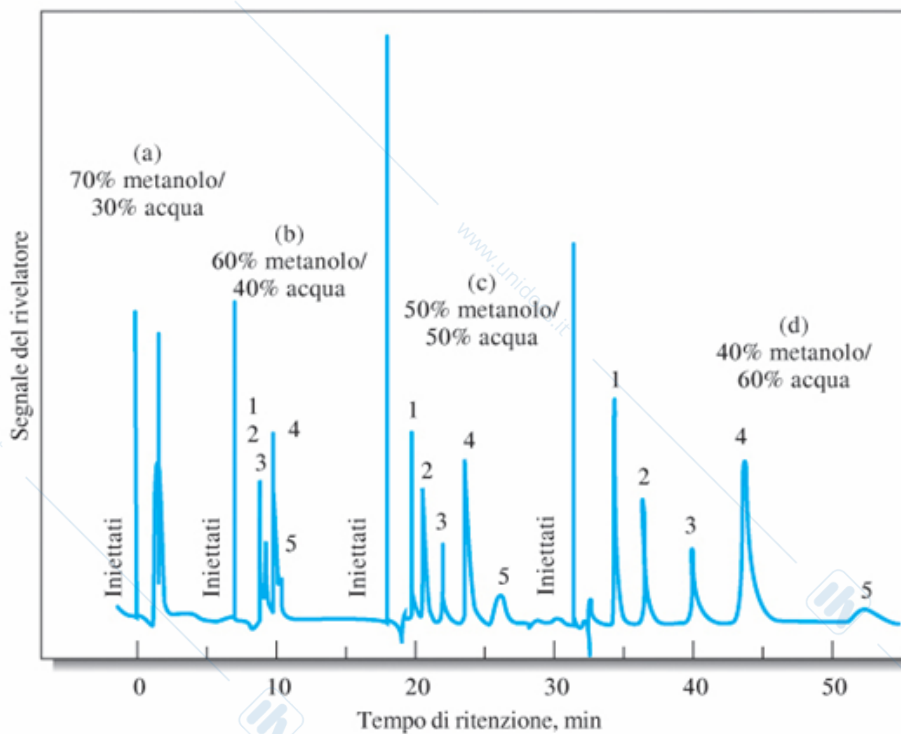


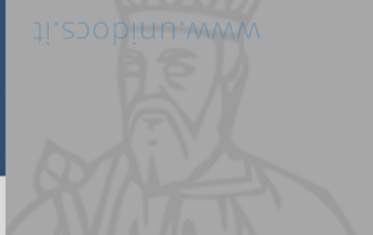
Ottimizzazione della separazione

Per ottimizzare la separazione cromatografica è necessario trovare le condizioni in cui tutti gli analiti sono sufficientemente separati. Questo si realizza variando alcuni parametri sperimentali come la composizione della fase mobile.

Quando la composizione della fase mobile rimane la stessa durante tutta la separazione si parla di condizioni isocratiche, queste condizioni sono le più semplici da applicare ma alcune volte non sono sufficienti e si ricorre alla separazione con un gradiente.

Nella separazione con gradiente la fase mobile diventa via via più competitiva nei confronti della fase stazionaria e questo riduce i tempi di ritenzione.





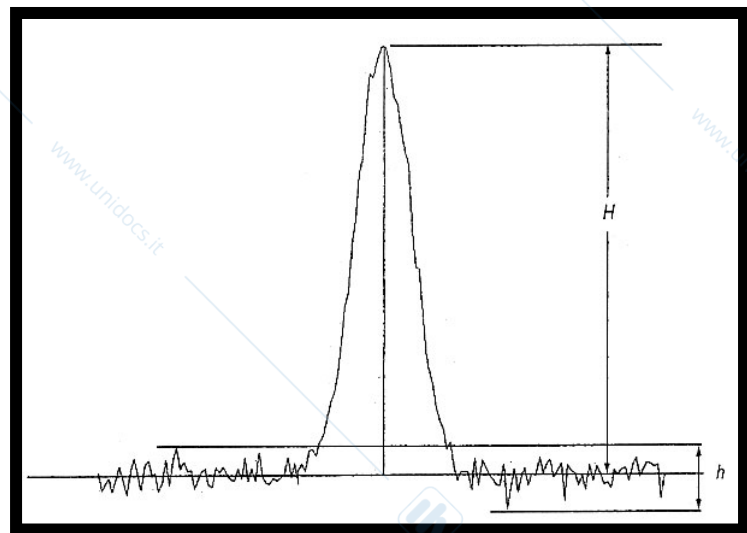
IDENTIFICAZIONE:

Tempo di ritenzione (t_r)

Ci si basa sul confronto con uno standard

Rapporto segnale rumore (influenza la precisione del dosaggio)

$$S/N = 2H/h$$

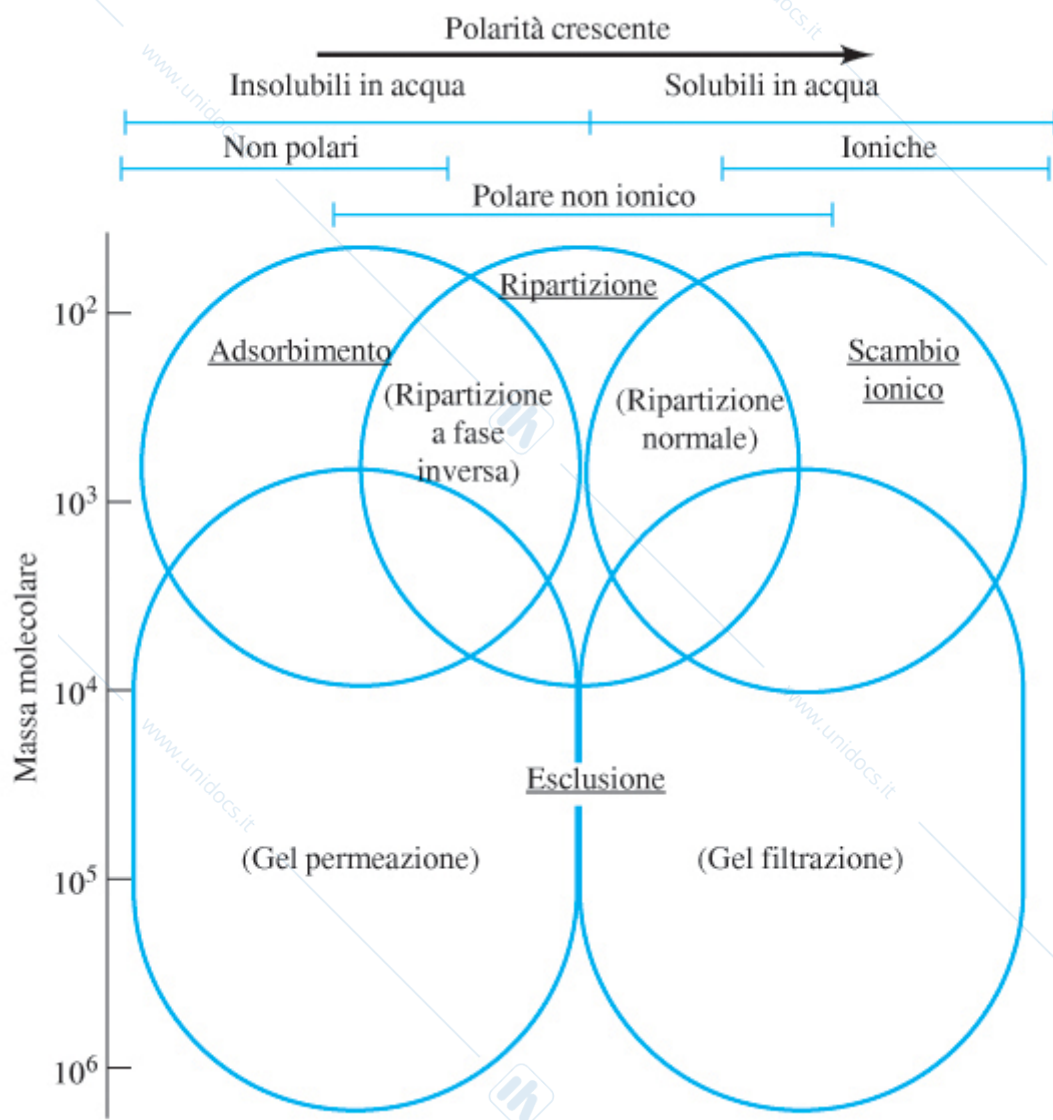
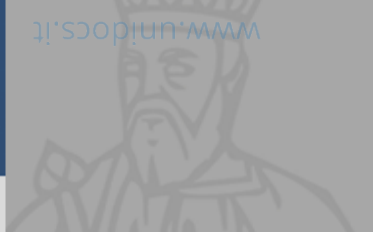


DOSAGGIO:

Area del picco

Metodo dello standard esterno

Metodo dello standard interno



Ogni singola molecola è caratterizzata da sue caratteristiche:

- Peso molecolare (ingombro sterico)
- Presenza/assenza di gruppi ionizzabili
- Presenza/assenza di regioni idrofobiche
- Struttura tridimensionale
- Solubilità in determinati solventi

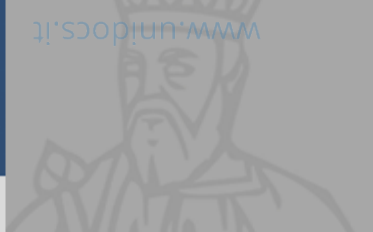
Cromatografia liquida

La cromatografia liquida è impiegata per la separazione di sostanze non volatili, neutre o ioniche, e per sostanze termolabili. Si presta facilmente a misure quantitative. Si possono separare sostanze appartenenti a varie classi tra cui:

- aminoacidi, peptidi e proteine
- idrocarburi
- carboidrati
- terpenoidi
- ioni inorganici

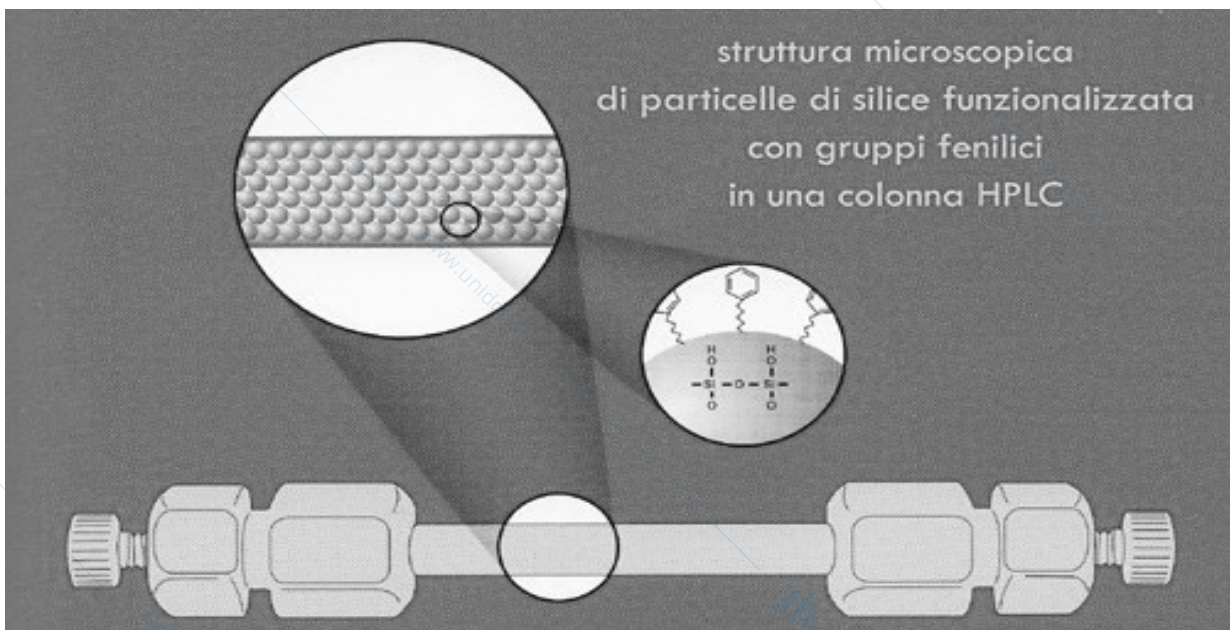
Nella cromatografia classica si usano colonne in vetro riempite di un materiale adsorbente come silice, allumina e derivati della cellulosa e l'eluente fluisce per effetto della gravità o per leggera pressione.

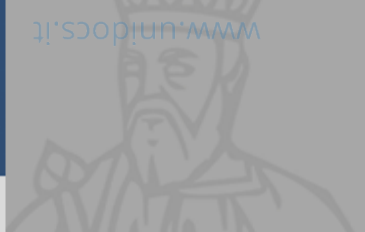
In HPLC lavorando ad alta pressione, si utilizzano colonne in acciaio lunghe 10-15 cm entro le quali viene impaccata la fase stazionaria.



Il materiale di riempimento della colonna è costituito da particelle di piccola dimensione le cui proprietà giocano un ruolo fondamentale nel processo di separazione cromatografica. Le fasi stazionarie sono legate su supporti costituiti da silice che vede funzionalizzati con opportuni sostituenti i gruppi OH.

Le fasi legate possono essere polari (ammino gruppo o ciano gruppo), apolari (catena alchilica come la octadecilica, C18), a scambio ionico.





Tra i materiali più comunemente utilizzati troviamo la silice e i polimeri a base stirenica (polistirene/divinilbenzene), con una porosità controllata all'interno di ciascun granulo (diametro dei pori da 120 a 200 angstrom circa).

Questi materiali possono essere in grado di stabilire interazioni dirette con i soluti, ma sono prevalentemente funzionalizzati, cioè i granuli di silice o di resina stirenica sono legati chimicamente tramite opportune reazioni a specifici gruppi funzionali.

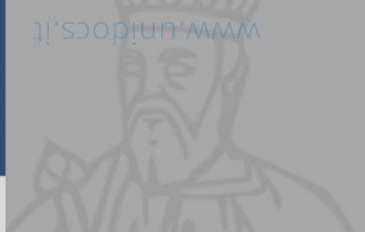
Il gruppo alchilico più frequentemente usato è il n-octadecile (C_{18}) e il n-ottile (C_8). I gruppi di idrocarburi a catena lunga si allineano parallelamente l'uno all'altro e perpendicolarmente alla superficie della silice.



dimensioni e materiali diversi per colonne LC



Tipo	Sostituente	Applicazioni
Alchile	C_4H_8 C_8H_{17} $C_{18}H_{37}$	Fase inversa
Fenile	C_6H_5 C_4F_5	Fase inversa
Ciano	$-(CH_2)_3CN$	Fase normale e fase inversa
Ammino	$-(CH_2)_3NH_2$	Fase normale e fase inversa; debole scambiatore cationico
Diolo	$-(CH_2)_3OCH_2CH(OH)CH_2OH$	Fase normale
Ammide	$-(CH_2)_3NHCOC_{13}H_{27}$	Fase inversa
Carbammato	$-(CH_2)_3OCONHC_8H_{17}$	Fase inversa
Acido sulfonico	$-(CH_2)_3SO_3H$ $-C_6H_4SO_3H$ $-(CH_2)_3C_6H_4SO_3H$	Scambiatrice cationica forte
Acido carbossilico	$-(CH_2)_3OCH_2COOH$ $-(CH_2)_3COOH$ $-(CH_2)_3C_6H_4CH_2COOH$	Scambiatrice cationica debole
Dimetilammina	$-(CH_2)_3N(CH_3)_2$	Scambiatrice anionica debole
Ammina quaternaria	$-(CH_2)_3N(CH_3)_2$	Scambiatrice anionica forte



Riguardo all'eluente i solventi usati in HPLC devono essere puri, compatibili con il detector e avere bassa viscosità. E' molto importante inoltre la polarità dei solventi.

Tra gli indici proposti per valutare la polarità quello più utile è l'indice di Snyder che si basa sulla misura delle interazione dei solventi con tre analiti: diossano (accettore di protoni con basso momento di dipolo), nitrometano (accettare di protoni con elevato momento dipolare) ed alcol etilico (donatore di protoni con elevato momento dipolare). La somma delle 3 costanti di interazione fornisce l'indice di polarità che è la forza solvente dei vari solventi.

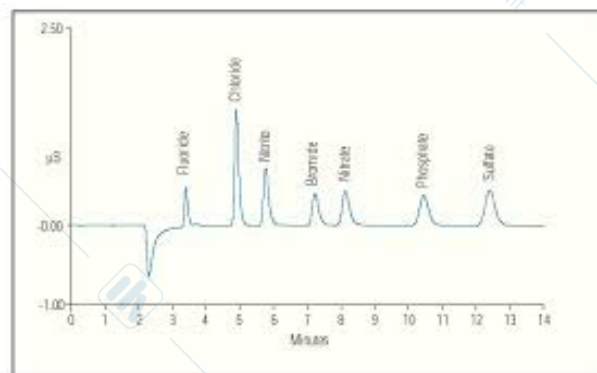
L'indice di polarità varia da +10,2 per l'acqua a -2 per i fluoroalcani completamente apolari. Miscelando due solventi l'indice di polarità è dato dalla somma dei valori ottenuti moltiplicando l'indice di polarità del solvente per la sua frazione molare presente.

Gli eluenti per fase inversa sono di solito miscele di acqua, o meglio tamponi acquosi con solventi organici miscibili con acqua e di polarità elevata (acetonitrile, metanolo, etanolo, tetraidrofurano)



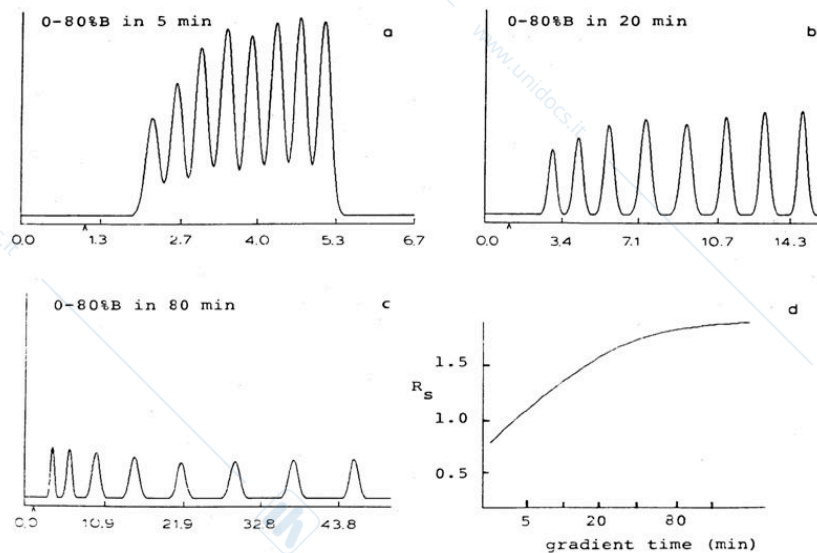
ELUIZIONE ISOCRATICA

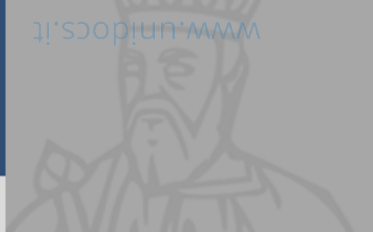
Eluizione con l'utilizzo di un solo solvente o una miscela di solventi di composizione costante



ELUIZIONE IN GRADIENTE

Si operano variazioni continue della composizione del solvente per aumentarne la forza eluente. Una forza eluente crescente è necessaria per eluire i soluti più fortemente trattenuti e per migliorare le separazioni





Cosa determina la ripartizione tra le due fasi?

Le interazioni di TIPO NON COVALENTE che si stabiliscono fra le molecole e le due fasi

- ✓ Legami idrogeno
- ✓ Interazioni elettrostatiche
- ✓ Forze di van der Waals
- ✓ Interazioni idrofobiche

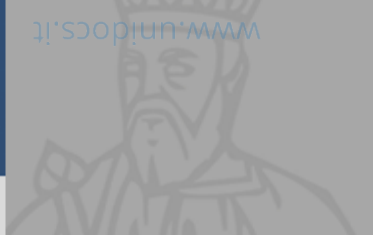
L'accessibilità differenziale alla fase stazionaria

- ✓ Dimensioni delle molecole

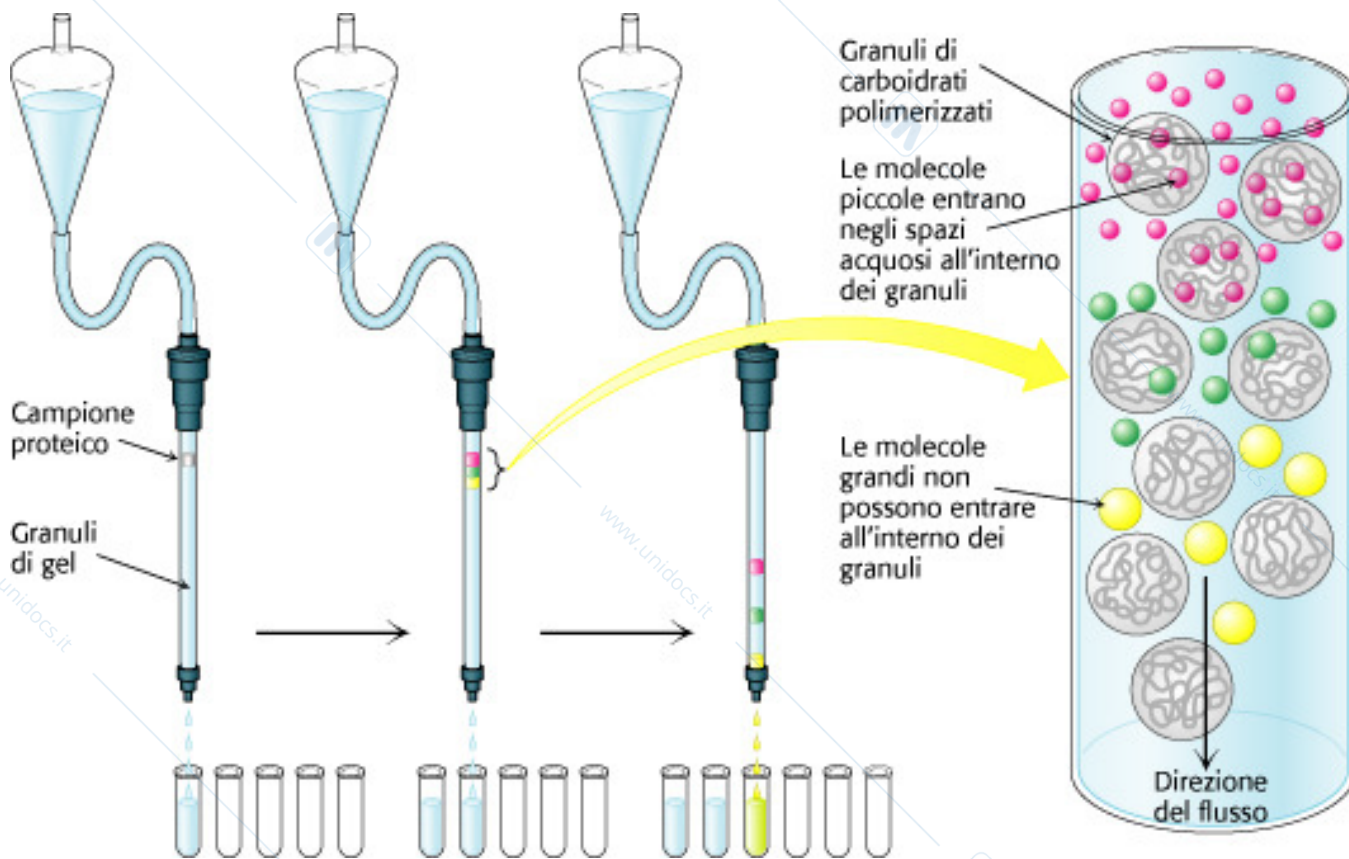
Ripartizione differenziale delle molecole tra le due fasi

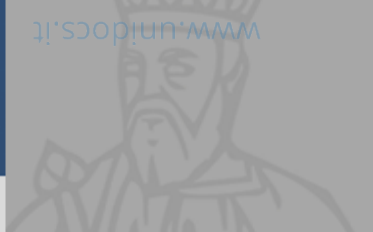
Coefficiente di Distribuzione (K)

$$K = [M]_s / [M]_m$$



Esclusione dimensionale



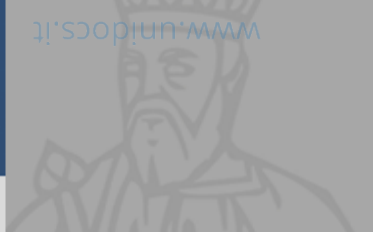


Se una molecola di analita è grande è completamente esclusa dalla fase mobile presente all'interno del gel, il suo K è pari a 0, mentre se l'analita è sufficientemente piccolo da avere completo accesso alla fase mobile interna, il suo K è pari a 1.

A causa della variabilità delle dimensioni dei pori tra le particelle di gel, solo una parte della fase mobile interna sarà accessibile agli analiti di dimensioni intermedie; quindi i loro valori di K variano tra 0 e 1.

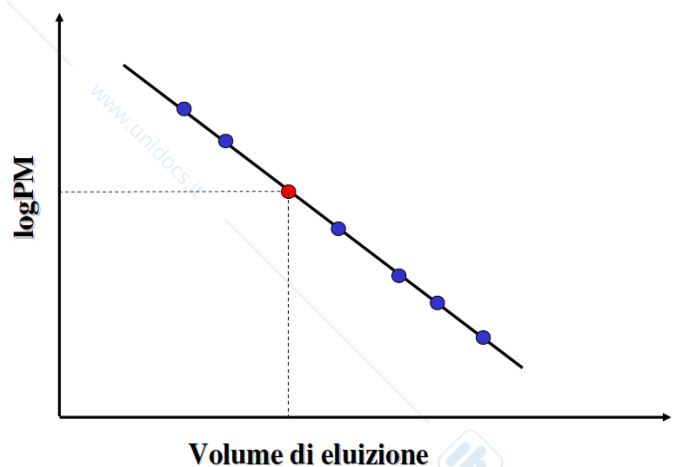
Questo rende possibile su un determinato gel, la separazione degli analiti in un intervallo di dimensioni estremamente ristretto.

<u>Nome commerciale</u>		<u>Polimero</u>	<u>Intervallo di frazionamento (kDa)</u>
<i>Sephadex</i>	G-10	Destrano	0.05 - 0.7
	G-25	Destrano	1 - 5
	G-50	Destrano	1 - 30
	G-100	Destrano	4 - 150
	G-200	Destrano	5 - 600
<i>Bio-Gel</i>	P-2	Poliacrilammide	0.1 - 1.8
	P-6	Poliacrilammide	1 - 6
	P-10	Poliacrilammide	1.5 - 20
	P-30	Poliacrilammide	2.4 - 40
	P-100	Poliacrilammide	5 - 100
	P-300	Poliacrilammide	60 - 400
<i>Sepharose</i>	6B	Agarosio	10 - 4000
	4B	Agarosio	60 - 20000
	2B	Agarosio	70 - 40000



La cromatografia di esclusione dimensionale può essere usata per ricavare il PM di una proteina; può essere utilizzata per allontanare i sali da soluzioni di composti ad alto peso molecolare.

Le sostanze ad alto peso molecolare sono escluse dai pori, mentre i composti a basso peso molecolare si muovono lentamente. Tale metodo è usato per allontanare il solfato di ammonio da preparazioni proteiche ed i sali dai campioni eluiti dopo cromatografia a scambio ionico. Può essere usata per la determinazione di sostanze a alto peso molecolare.



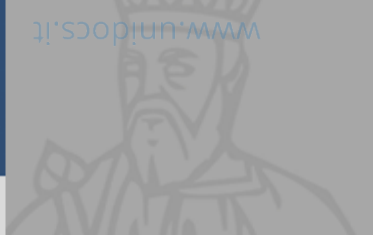
Cellule di *E. coli* contenenti la RNasi A

Lisi mediante ultrasuoni
(sonicazione)

Omogenato cellulare

Centrifugazione
(eliminazione detriti cellulari)

Sopranatante dell'omogenato cellulare
contenente la RNasi A



Sopranatante dell'omogenato cellulare

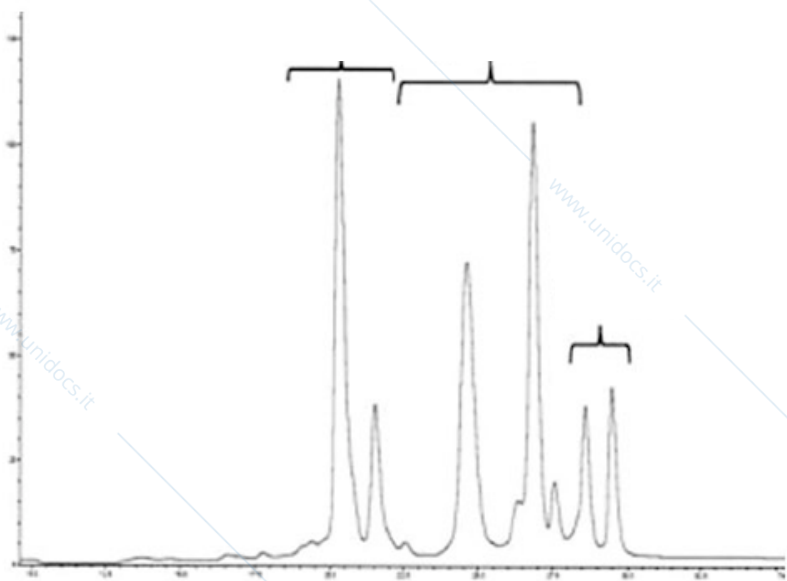


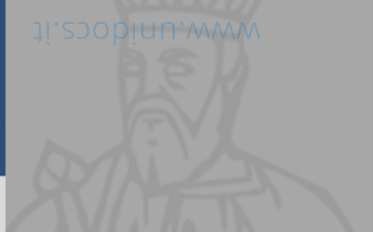
Cromatografia per gel filtrazione



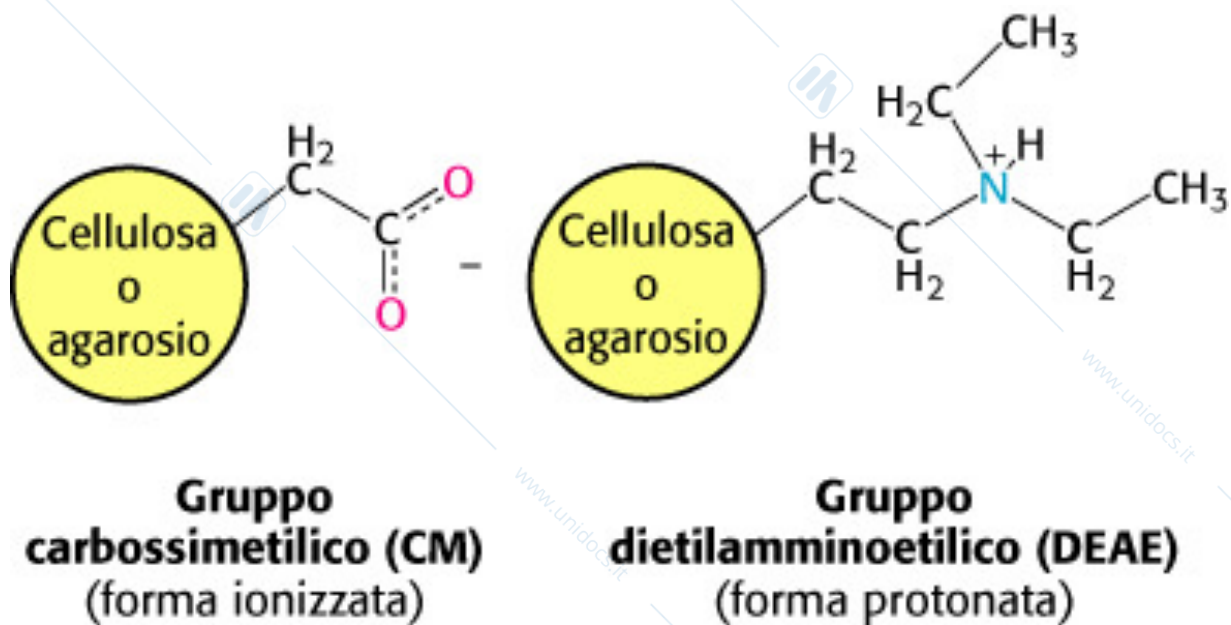
Resina SEPHADEX G-75
capacità di separazione 5-70 KDa

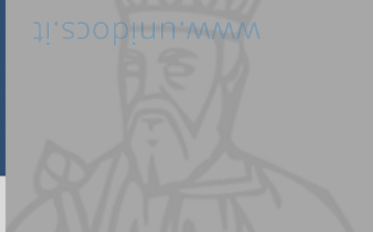
Eluente – Tris-acetato 0,1 M pH 8,4 contenente NaCl 0,3 M





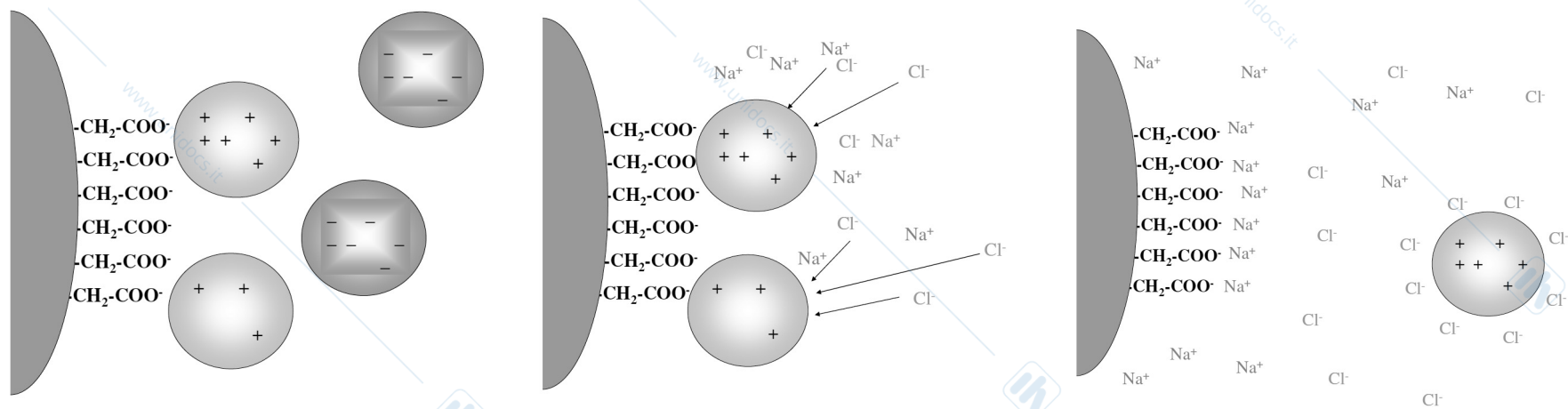
Le proteine possono essere purificate anche sfruttando la carica

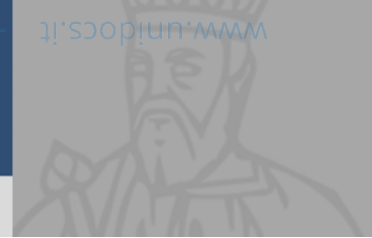




Il meccanismo dello scambio ionico si basa sui seguenti passaggi:

- Diffusione dello ione sulla superficie di scambio
- Diffusione dello ione all'interno della matrice fino al sito di scambio
- Scambio degli ioni al sito di scambio
- Diffusione dello ione che è stato scambiato sulla superficie dello scambiatore
- Distacco selettivo della molecola di interesse per:
 1. Variazioni di pH e/o di forza ionica
 2. Eluizione per affinità - è introdotto nel sistema uno ione che presenta affinità maggiore per lo scambiatore rispetto allo ione legato





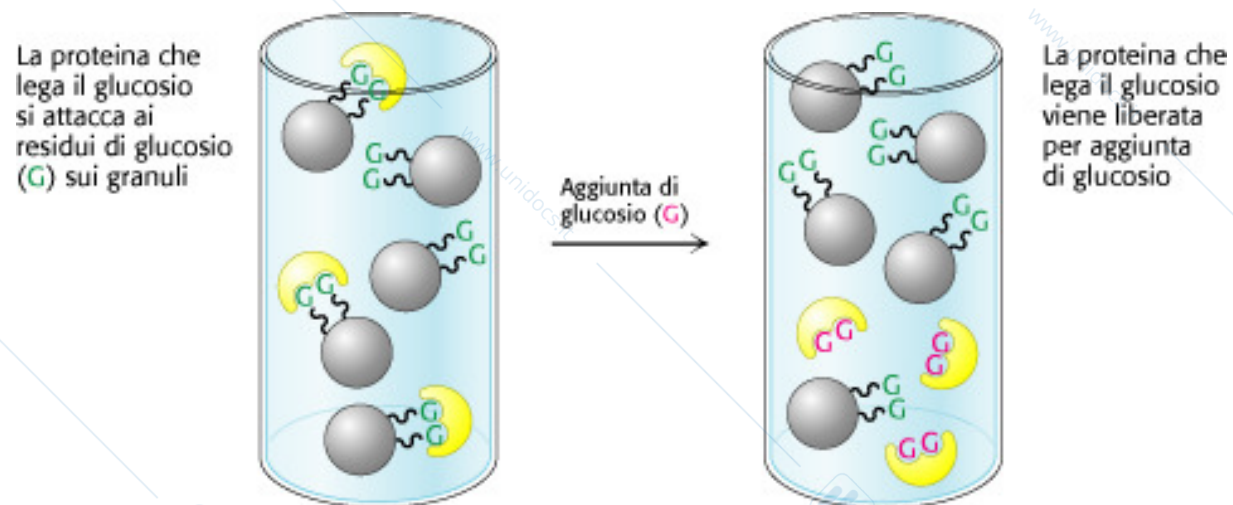
Le proteine possono essere separate anche tramite la cromatografia di affinità che si basa sulla specificità delle interazioni biologiche per ottenere la separazione e la purificazione delle molecole.

Un ligando specifico per la molecola di interesse è legato covalentemente ad una matrice insolubile.

E' necessario che le molecole da isolare siano in grado di legare il ligando in maniera specifica e reversibile.

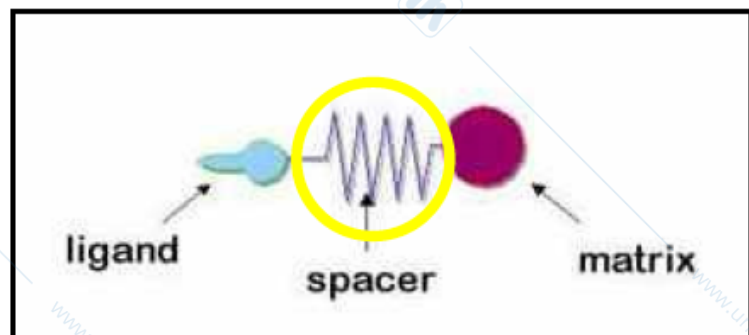
FASE STAZIONARIA solida – ligando immobilizzato

FASE MOBILE liquida



La matrice deve possedere un numero sufficiente di siti, ai quali è legato covalentemente lo specifico ligando.

- Deve essere stabile nelle condizioni di legame e durante la successiva eluizione
- Deve interagire solo debolmente con le altre macromolecole, riducendo così al minimo l'adsorbimento aspecifico
- Le matrici più utilizzate sono i destrani, agarosio, poliacrilammide, polistirene, cellulosa.



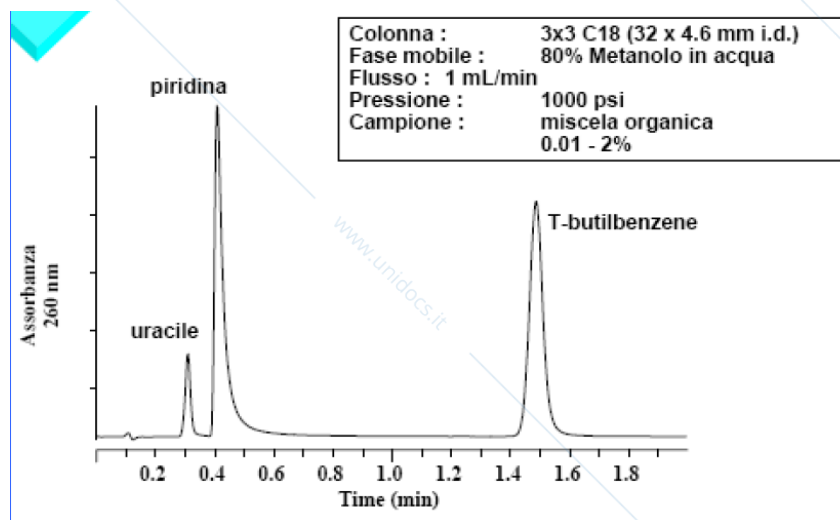
Per evitare che il ligando interagisca con la matrice interferendo nel meccanismo di separazione, si usano dei "bracci spaziatori" che sono costituiti da una breve catena di atomi di carbonio (circa 6).

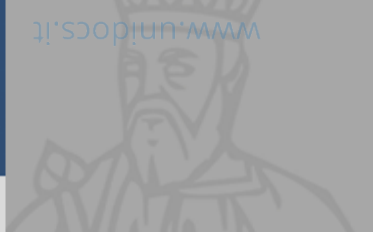
L'eluizione può essere aspecifica per variazione di pH o forza ionica del tampone usato per caricare il campione e che diviene l'eluente o specifica per aggiunta di un competitore cioè di un composto che ha maggiore affinità per il ligando rispetto alla molecola da purificare

Cromatografia di Ripartizione

PRINCIPIO: sfrutta l'idrofobicità superficiale delle proteine (residui di aa non polari)

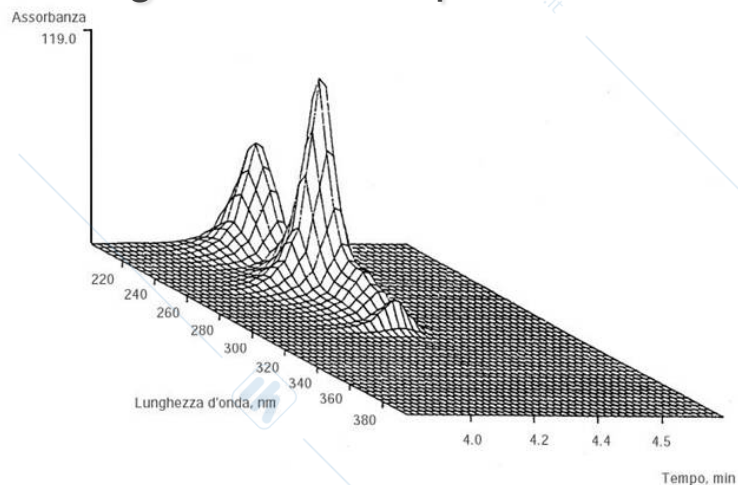
- FASE STAZIONARIA: matrice inerte a cui sono legati gruppi idrofobici (radicali o gruppi ottilici, fenilici, butilici)
- FASE MOBILE: tampone polare a concentrazione salina decrescente (riduzione degli effetti idrofobici).





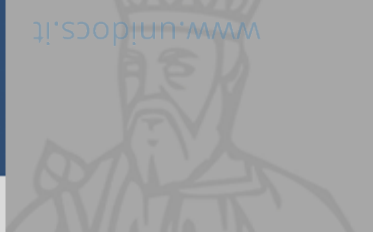
Rivelatori per HPLC

- **Spettrofotometrico UV-visibile:** misura l'assorbanza dell'eluato a λ fissa
 - È il rivelatore più diffuso (copre più del 70% dei metodi di rivelazione)
 - sensibile a moltissime sostanze organiche ed inorganiche (es. 254 nm)
 - sensibilità tipica: 0.1 ppb
- **Spettrofotometrico UV-visibile con Diode-array:** misura l'assorbanza dell'eluato in un range di λ , restituendo in ogni istante lo spettro UV-vis



Gruppi cromofori

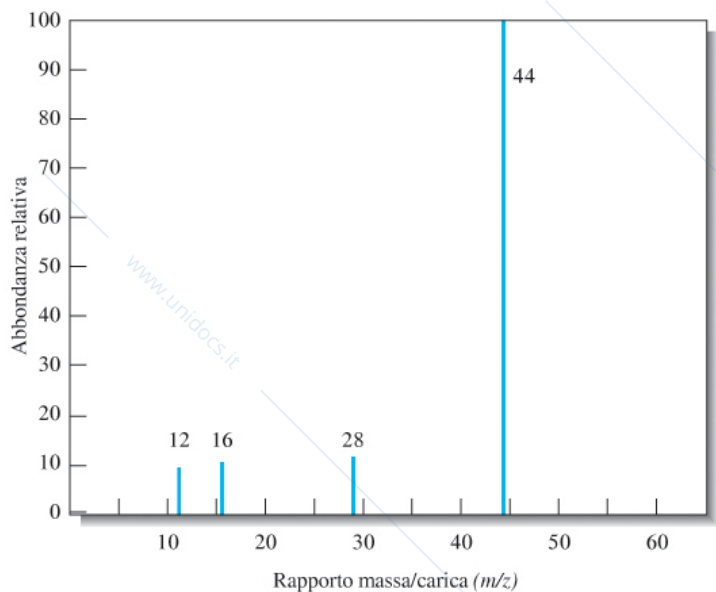
Cromoforo	Formula	λ_{max} (nm)	ϵ
aldeide	-CHO	210	1.500
amino	-NH ₂	195	2.800
azo	-N=N-	285-400	3-25
bromuro	-Br	208	300
carbossile	-COOH	200-210	50-70
chetone	-C=O	195	1.000
disolfuro	-S-S-	194	5.500
estere	-COOR	205	50
etere	-O-	185	1.000
etilene	-C=C-	190	6.000
fenile	-C ₆ H ₅	202, 255	
naftile	-C ₁₂ H ₁₁	220, 275	
nitrato	-ONO ₂	270	12
nitrito	-ONO	220-230	1.000-2.000
nitrile	-C=N	160	-
nitro	-NO ₂	210	forte



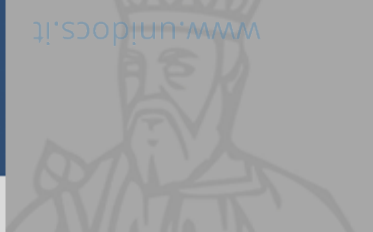
Rivelatore a spettrometria di massa

Questo rivelatore impiega uno spettrometro di massa. L'analita è ionizzato e/o frammentato e entrando nello spettrometro di massa si ottiene il suo spettro m/z , solitamente caratterizzato dal picco dello *ione molecolare*, corrispondente al PM della molecola meno un elettrone, e da picchi relativi a *frammenti* della molecola originaria

L'interfacciamento tra un sistema cromatografico e un rivelatore non convenzionale come MS è spesso definito *ifenazione*, dall'inglese hyphen che indica il trattino di sillabazione



Spettro di massa della CO_2 . Lo ione molecolare compare a $m/z = 44$ ($C = 12$, $O = 16$); gli ioni frammento compaiono a $m/z = 28$ (CO^+), 16 (O^+) e 12 (C^+). Oltre a questi segnali devono comparire i picchi delle specie isotopiche (es. i frammenti che contengono ^{13}C anziché ^{12}C)



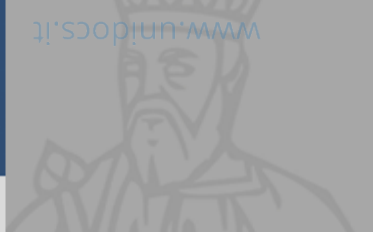
Cromatografia ionica

Nella cromatografia ionica la fase stazionaria è un solido contenente gruppi ionizzati (es. $-\text{SO}_3^-$, $-\text{NH}_3^+$) con i rispettivi controioni, mentre la fase mobile è una soluzione contenente ioni che sono in grado di competere con gli ioni presenti nel campione per i siti carichi della fase stazionaria

Mentre l'interazione tra soluti e fase stazionaria è basata sull'attrazione coulombiana tra cariche di segno opposto, la separazione è garantita dalla competizione tra soluti e fase mobile.

Attraverso la scelta opportuna del sistema fase mobile - fase stazionaria è possibile separare sostanze ioniche o ionizzabili, sia inorganiche che organiche.

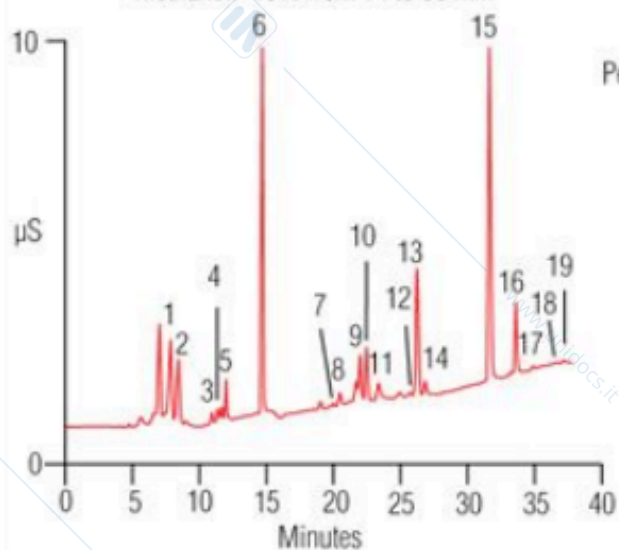
I rivelatori impiegati nella cromatografia ionica possono essere quelli convenzionali per cromatografia liquida, ma normalmente si impiega il rivelatore a conducibilità, specifico per sostanze ioniche



Separation of Anions in Beer Using the IonPac AS11 Column

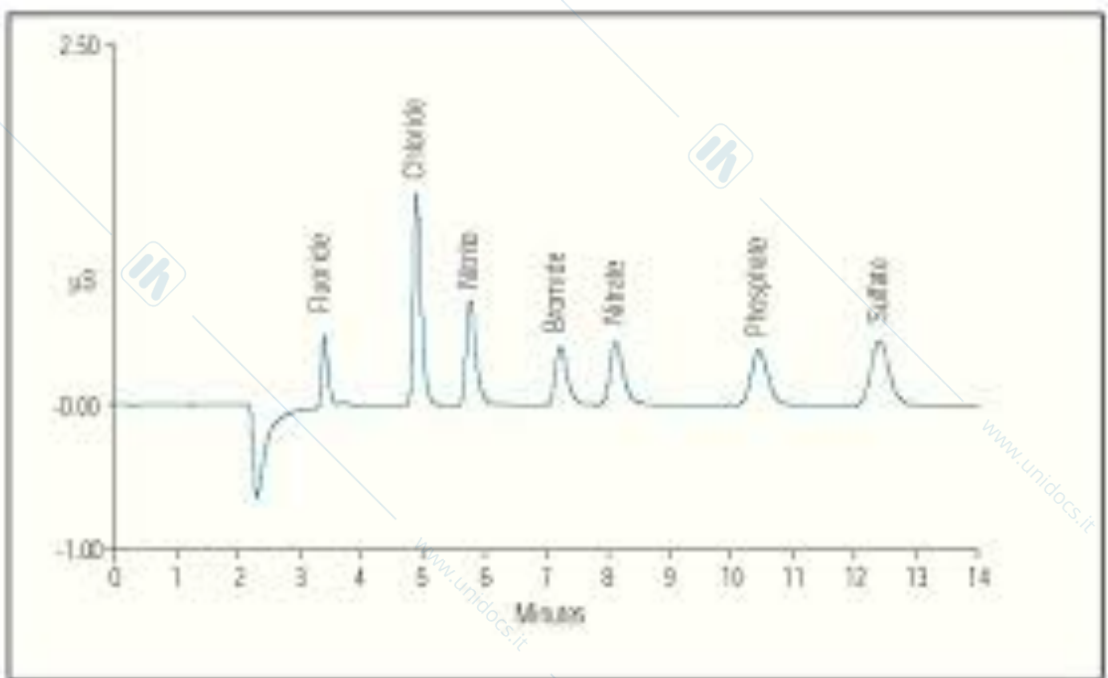
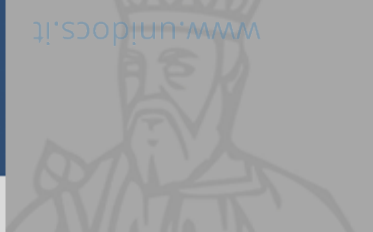
Column: IonPac AG11-HC, AS11-HC, 4 mm
 Eluent: Sodium hydroxide: 1 mM from 0 to 8 min,
 1 mM to 15 mM from 8 to 18 min,
 15 mM to 30 mM from 18 to 28 min,
 30 mM to 60 mM from 28 to 38 min;
 Methanol: 18% from 14 to 38 min

Flow Rate: 1.5 mL/min
 Temperature: 30 °C
 Sample Prep: Diluted 1:5, treated with OnGuard-RP
 Inj. Volume: 10 µL
 Detection: Suppressed conductivity,
 ASRS-ULTRA 4 mm, AutoSuppression
 external water mode



Peaks:	1.	Lactate	11.	Carbonate
	2.	Acetate	12.	Fumarate
	3.	Formate	13.	Sulfate
	4.	Butyrate (2 ppm)	14.	Oxalate
	5.	Pyruvate	15.	Phosphate
	6.	Chloride	16.	Citrate
	7.	Bromide	17.	Isocitrate
	8.	Nitrate	18.	cis-Aconitate
	9.	Succinate	19.	trans-Aconitate
	10.	Malate		

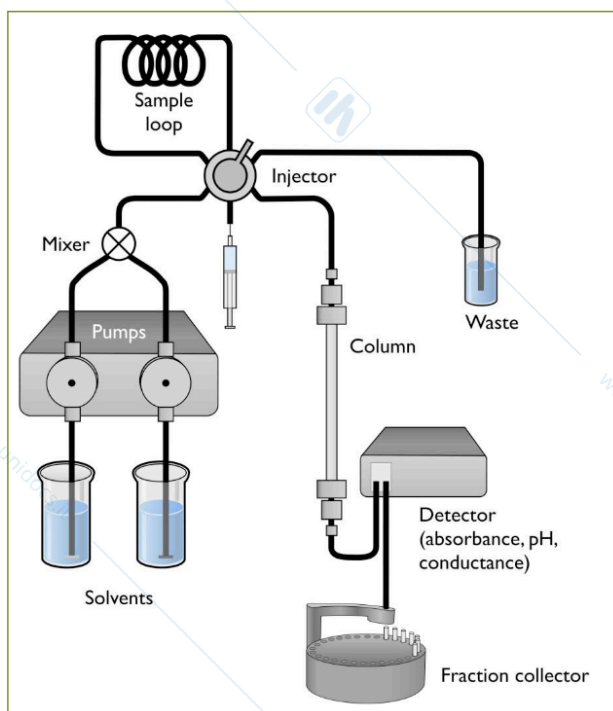
13488



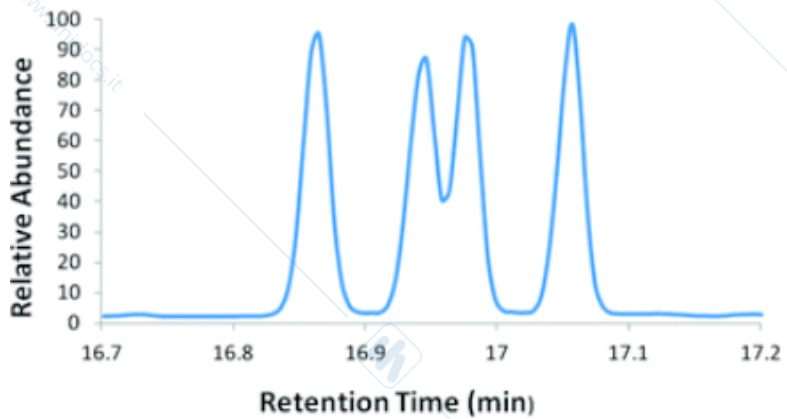
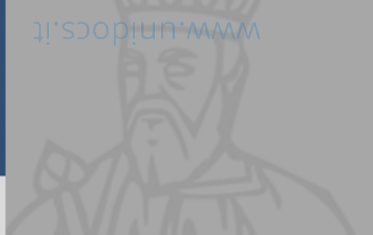
Strumentazione per HPLC

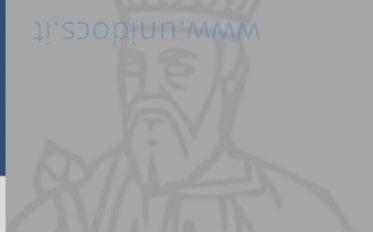
Un cromatografo HPLC è costituito dalle seguenti parti:

- *riserva di solventi*: uno o più solventi che possono essere utilizzati singolarmente o in miscela



- *pompa* con pressione fino a 400 Atm, flusso stabile tra 0.1 e 10 ml/min
- *sistema di iniezione* costituito da una valvola a più vie e da un circuito a volume fisso, o *loop*, nel quale si mette il campione
 - *colonna cromatografica* ed eventuale *precolonna*
 - *rivelatore* per monitorare gli eluati
 - *PC* per gestire il sistema e i dati





Gas Cromatografia

La gascromatografia è impiegata per la separazione di sostanze volatili. Si presta meno facilmente a misure quantitative rispetto alla LC, in compenso ha maggiori potenzialità dal punto di vista diagnostico. Si possono separare sostanze appartenenti a varie classi tra cui:

- aromi (terpeni, esteri)
- idrocarburi a catena corta
- acidi carbossilici
- composti di interesse biochimico
- È basata sulla differenza nella distribuzione di analiti tra due fasi non miscibili (stazionaria e mobile)
- La fase mobile è un gas che si muove passando attraverso la fase stazionaria contenuta nella colonna.
- È applicabile a sostanze o loro derivati che sono volatilizzabili alle temperature impiegate.

COLONNE

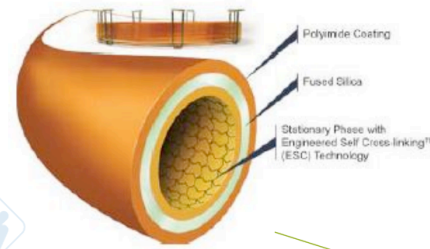
CAPILLARI (di silice fusa con pareti rivestite da fase stazionaria).

IMPACCATE (con particelle inerti impregnate con la fase stazionaria).

COLONNE CAPILLARI – sono lunghe da 5 a 60 m e hanno un diametro interno da 0.1 a 0.53 mm. Il liquido o fase stazionaria è un film di spessore 0.1mm – 5 mm.

COLONNE IMPACCATE – sono fatte di vetro o metallo con lunghezza da 1 a 3 m e diametro interno da 2 a 4 mm. Le fasi stazionarie sono polimeri porosi o supporti solidi inerti (o la cui reattività è stata ridotta per silanizzazione) impregnati con la fase liquida.

COLONNE



Colonne capillari danno la risoluzione molto alta

$N \rightarrow 100\ 000$ piatti

Quantità del campione molto bassa

<http://www.phenomenex.com/>

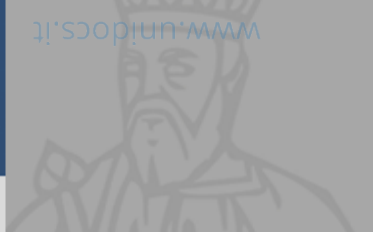
Colonne impaccate

Colonne tubolari aperte o capillari

Fase stazionaria liquida

FASI STAZIONARIE

- fase stazionaria solida in cui si ha un fenomeno di adsorbimento fisico.
- fase stazionaria liquida immobilizzata sulla superficie di un solido inerte.



Fase mobile

Gas ultra-puri: elio, idrogeno, nitrogeno, argon 99,9999%

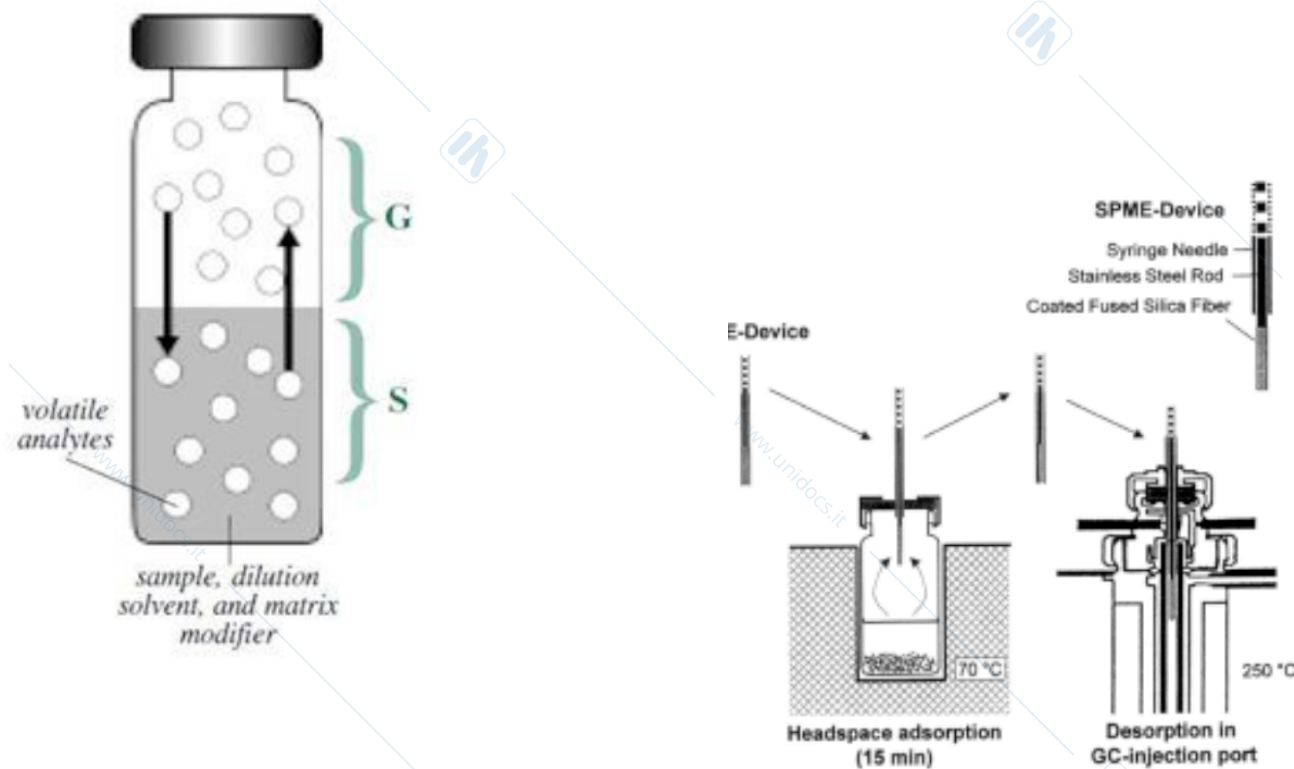
Velocità del flusso: 25-50 ml/min

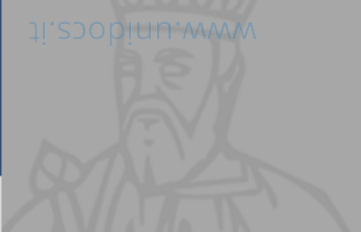
Pressioni nelle GC colonne: 10-50 psi

INIEZIONE DIRETTA - usando una siringa o una valvola di iniezione o iniettando la soluzione dell'analita in una camera di vaporizzazione.

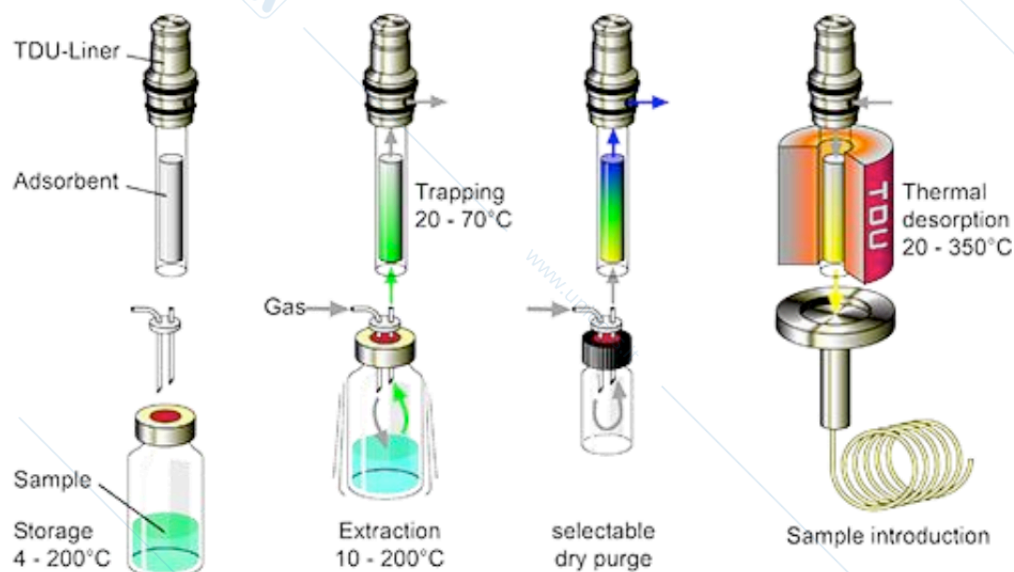
INIEZIONE DELLA FASE VAPORE – sistema di iniezione *spazio di testa* statico o dinamico.

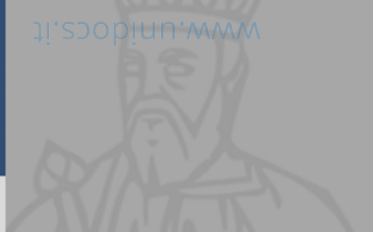
Spazio di testa statico – il campione solido o liquido è posto in vials, contenute in una camera riscaldata, per un periodo di tempo fissato che permette al campione di raggiungere l'equilibrio tra la fase non gassosa e la fase vapore. Dopo che è stato raggiunto l'equilibrio una quantità fissata dello spazio di testa della vial fluisce nel gas cromatografo trasportata dal gas di trasporto





Spazio di testa dinamico – le sostanze volatili presenti nel campione sono deviate in una colonna adsorbente mantenuta a bassa temperatura. Le sostanze ritenute sono poi desorbite nella fase mobile mediante rapido riscaldamento della colonna.





RIVELATORI per GC

FID (rivelatore ad ionizzazione di fiamma)

L'effluente della colonna è miscelato con idrogeno e aria e quindi combusto per via elettrica. La maggior parte dei composti organici per pirolisi produce ioni ed elettroni che conducono l'elettricità attraverso la fiamma. Applicando una ddp si registra una corrente che è opportunamente amplificata e quindi registrata.

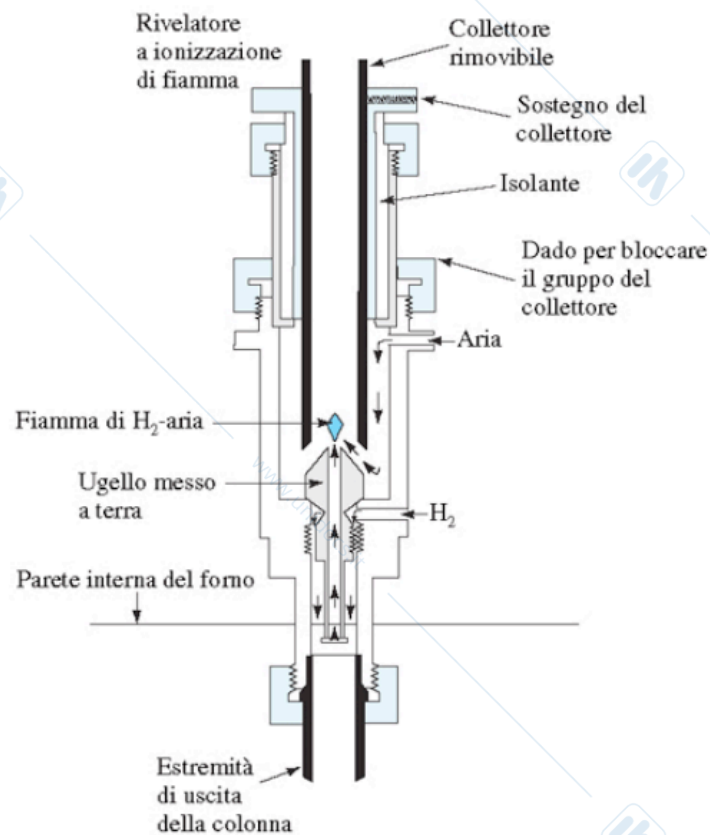
Tale rivelatore risponde al numero di atomi di Carbonio che entrano nel rivelatore per unità di tempo (è sensibile alla massa e non alla concentrazione).

È utilizzato per il rilevamento gas cromatografico degli idrocarburi (come il butano o l'esano) e in generale delle sostanze organiche. Ha un range di rilevamento lineare di 6-7 ordini di grandezza, con un limite inferiore di rilevamento pari a meno di un picogrammo.

Lo strumento permette di rilevare solo i composti che possono bruciare, altri componenti possono essere ionizzati attraverso il passaggio lungo la fiamma, ma non possono produrre un segnale sufficientemente intenso, tale da essere rilevato dallo strumento.

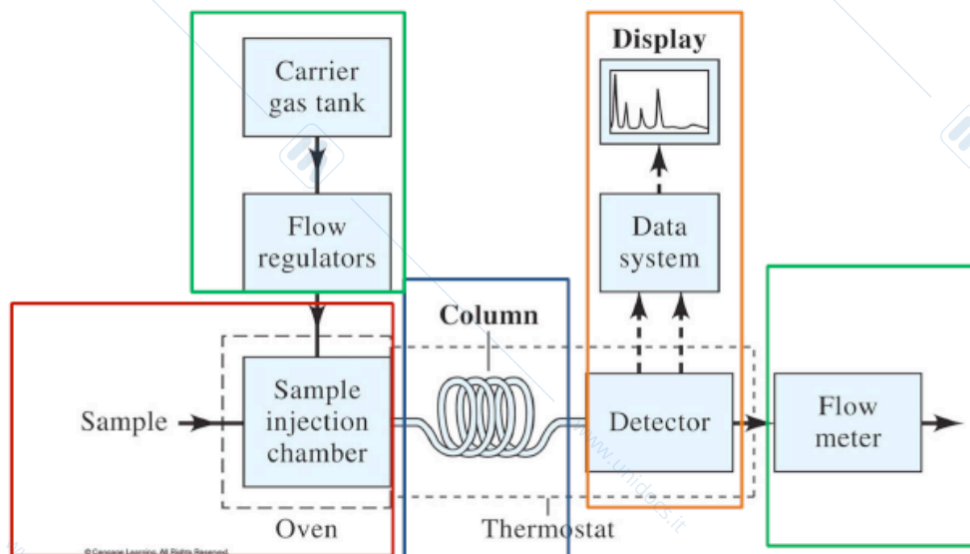
Ad esempio nell'analisi dei gas di scarico, lo strumento può rilevare degli idrocarburi incombusti, ma non l'azoto (così come altri gas permanenti, come l'anidride carbonica). Per le molecole che contengono solo carbonio e idrogeno, lo strumento risponde in modo corretto, ma la presenza di altri atomi nelle molecole, come l'ossigeno, riduce la sensibilità dello strumento. Ad esempio la sensibilità verso il metano (CH_4) è eccellente ma quella relativa alla formaldeide (CH_2O) è più bassa. Essendo il FID un rivelatore distruttivo, deve essere utilizzato in fondo alla catena di rilevazione strumentale.

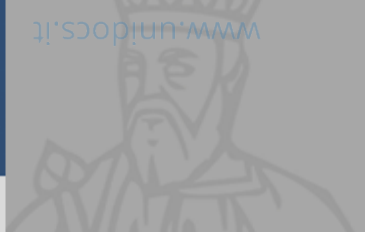
Il FID sfrutta la presenza di ioni nella fiamma. La sorgente degli ioni è l'idrogeno introdotto nella fiamma. La fiamma si ottiene dalla combustione di idrogeno in aria (eventualmente l'aria può essere sostituita con ossigeno puro) che pirolizza i composti organici producendo atomi carichi positivamente (cationi) ed elettroni. Al fine di determinare tali ioni due elettrodi sono disposti lungo il percorso della fiamma, il primo, caricato positivamente è posto all'uscita del bruciatore (il quale è una sorta di becco di bunsen), l'altro, caricato negativamente, è posizionato lungo la fiamma. I cationi prodotti dall'elevato calore della fiamma vengono attratti dall'elettrodo negativo ricco di elettroni. Nel momento dell'incontro del catione con l'elettrodo negativo, questi gli cede gli elettroni mancanti generando una debole corrente tra i due elettrodi. La corrente viene rilevata tramite un sensibile amperometro e quindi visualizzata su di un display.



TCD (rivelatore a conduttività termica)

Un rivelatore a conducibilità termica (TCD, Thermal Conductivity Detector) è costituito da due filamenti riscaldati elettricamente e mantenuti a temperatura costante. Su uno scorre il gas di trasporto puro, sull'altro scorre il gas in uscita dalla colonna. Quando una sostanza viene eluita, il secondo filamento subirà un raffreddamento. Tale variazione di temperatura si riflette in una variazione di resistenza, che viene amplificata e rappresenta il segnale del rivelatore.





Cromatografia planare

L'esecuzione dell'analisi è molto 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



Quindi il foglio o la lastrina si pongono in una vaschetta contenente la fase mobile che per gravità (modalità *discendente*), per

capillarità (modalità *ascendente*) fluisce sulla fase fissa trascinando gli analiti e separandoli

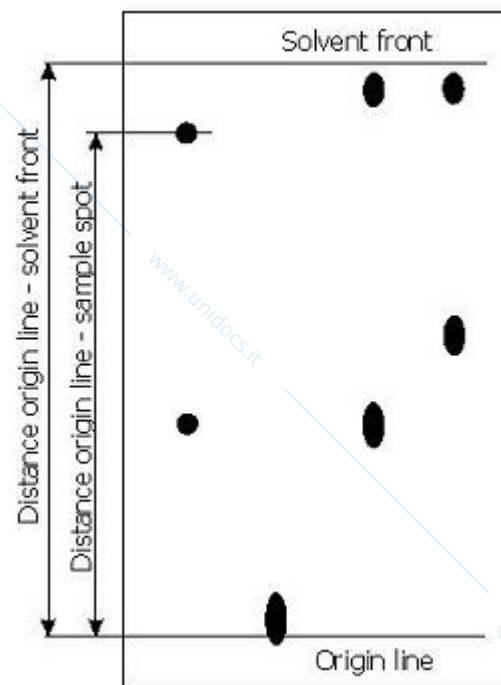


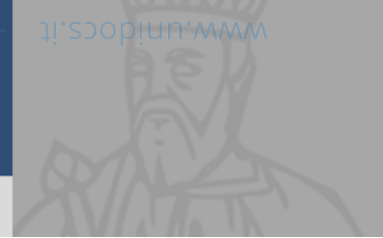
Il risultato è visualizzabile sotto forma di macchie, ognuna dovuta ad un componente della miscela. Il riconoscimento delle sostanze può avvenire effettuando separazioni su miscele standard; in questo caso il parametro che caratterizza i soluti separati è il cosiddetto R_f .

Per ogni analita il valore di R_f si ottiene misurando la distanza percorsa dal centro della macchia e confrontandola con la distanza percorsa dal fronte dell'eluente:

$$R_f = d_{\text{analita}} / d_{\text{eluente}}$$

Il valore di R_f degli analiti è quindi sempre compreso tra 0 e 1. I valori ottimali sono compresi tra 0.4 e 0.8





www.unidocs.it - Appunti e dispense per superare i tuoi esami universitari

www.unidocs.it - Appunti e dispense per superare i tuoi esami universitari