

# I METODI DI SEPARAZIONE: LE CROMATOGRAFIE

## Cromatografia

Il termine *cromatografia* indica un insieme di tecniche che hanno lo scopo di separare una miscela nei suoi componenti, per permetterne il riconoscimento qualitativo e quantitativo

Queste tecniche sono basate sulla distribuzione differenziale dei vari componenti 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

Le tecniche sono molto utilizzate in campo archeometrico, essendo particolarmente utili nell'analisi di miscele complesse come sono la maggior parte dei campioni di natura organica



Una **cromatografia** si basa sul fatto che i vari componenti di una **MISCELA** tendono a ripartirsi in modo diverso tra due **FASI**, in funzione della loro affinità con ciascuna di esse.

Una fase, un solido o un gel, rimane fissa (la *fase stazionaria*) un'altra fase, liquida o gassosa, (la *fase mobile*) fluisce su di essa trascinando con sé in quantità maggiore i componenti della miscela che più risultano affini a lei.



Separazione dei componenti di una goccia di inchiostro nero per TLC (THIN LAYER CHROMATOGRAPHY)

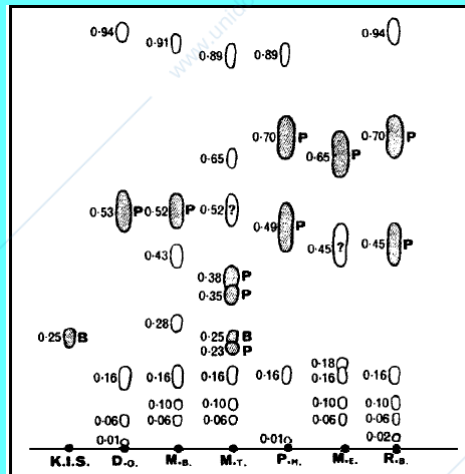
Nella pratica le separazioni cromatografiche si realizzano in 3 diversi modi:

- **su colonna:** la fase stazionaria viene impaccata in colonne di vetro o di metallo.
- **su strato sottile:** la fase stazionaria ricopre sotto forma di strato sottile piastre di vetro, plastica o di metallo.
- **su carta:** la fase stazionaria aderisce alle fibre di cellulosa di un foglio di carta

## Cenni preliminari

Le tecniche cromatografiche sono sempre distruttive (anche se in senso strettamente analitico possono in alcuni casi essere non distruttive), in quanto operano esclusivamente su campioni in soluzione o in fase vapore: i materiali oggetto di analisi vanno quindi disciolti in un opportuno solvente. Non è possibile l'analisi senza prelievo di campione né tanto meno l'analisi *in situ* (tranne con strumenti miniaturizzati)

Nonostante questa premessa scoraggiante, è bene precisare che il consumo di campione è minimo. Sono sufficienti da 1 ml a 1 µl di soluzione, corrispondenti a pochi mg di campione solido



Separazione di coloranti animali "porpora"

## CROMATOGRAFIE

- **PRINCIPIO GENERALE:** fase stazionaria (cd. "fissa", solida o liquida) di supporto e fase mobile (liquida o gas) che scorre a velocità diverse ( $\Rightarrow$  t diversi) a seconda delle molecole (masse, cariche) che trasporta  $\Rightarrow$  separazione-differenziazione

## Basi del procedimento cromatografico

- il campione è introdotto nella fase mobile, che può essere un gas, un liquido o un fluido supercritico
- la fase mobile viene fatta eluire in continuo attraverso la fase stazionaria, che deve essere immiscibile nell'eluente
- 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 ripartizione  $K_d=C_s/C_m$ )

## Interazione soluto-fasi

Le interazioni che si verificano tra le sostanze da separare e le due fasi (mobile e stazionaria) sono deboli: se così non fosse non ci sarebbe trattenimento sulla fase stazionaria oppure, al contrario, eluizione. Sono sfruttate a scopo separativo le seguenti interazioni:

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

## Cromatografia planare

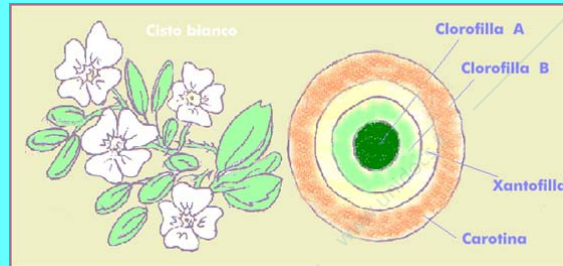
L'esecuzione dell'analisi è molto semplice: la miscela da separare va depositata sulla superficie, posandone con un tubo capillare una goccia su una linea che segna l'inizio del processo di eluizione



Quindi il foglio o la lastrina si pongono in una vaschetta contenente la fase mobile che per gravità (modalità *discendente*), per capillarità (modalità *ascendente*) o per diffusione laterale (modalità *orizzontale*) fluisce sulla fase fissa trascinando gli analiti e separandoli

## Esempio: pigmenti fogliari

Nella figura è mostrata la separazione per cromatografia su carta orizzontale di pigmenti fogliari da un estratto della pianta *Cisto bianco*; si tratta dei pigmenti che fanno cambiare il colore delle foglie nelle diverse stagioni. La separazione è ottenuta con un disco di carta da filtro come fase fissa e alcol etilico al 95 % come fase mobile.

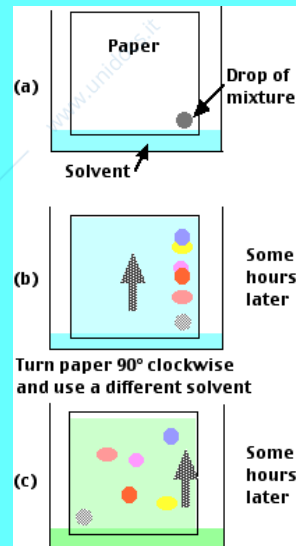
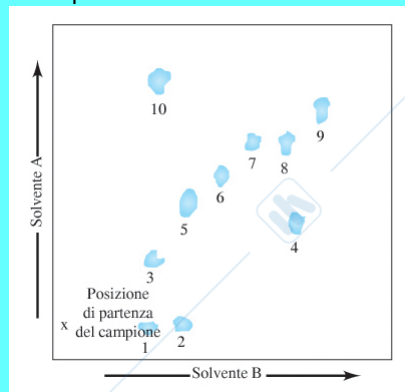


Gli aloni sono attribuiti alle diverse sostanze sulla base del loro comportamento chimico: le sostanze più idrosolubili (e quindi più affini all'acqua adsorbita sulla cellulosa, che costituisce la fase fissa) sono quelle al centro, cioè clorofille A e B; le sostanze meno idrosolubili, xantofilla e carotina, migrano all'esterno in quanto più affini alla fase mobile

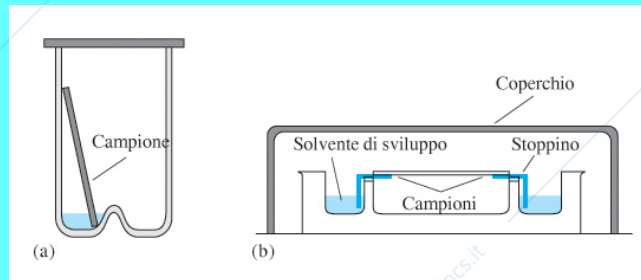
## Cromatografia planare bidimensionale

Per aumentare la separazione tra gli analiti e quindi la loro identificazione è possibile effettuare l'eluizione lungo due dimensioni, prima lungo un asse e poi, girando a 90° la lastrina, lungo l'asse ortogonale, eventualmente con una fase mobile differente: in questo modo le macchie sono separate in maniera più efficiente

Sotto: separazione di aminoacidi



## Cromatografia planare



(a) camera di sviluppo a flusso *ascendente*

(b) camera di sviluppo a flusso *orizzontale*

## Meccanismi della separazione

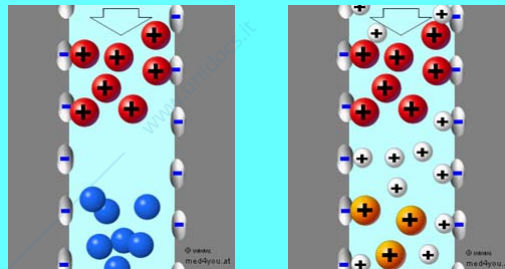
In base ai tipi di interazione possiamo suddividere i meccanismi di separazione impiegati in cromatografia in:

- **adsorbimento**
- **scambio ionico**
- **esclusione**
- **affinità**

## Scambio ionico

La fase stazionaria è costituita da un polimero inerte contenente siti attivi ionizzati o ionizzabili, i cui controioni possono essere scambiati con altri ioni aventi carica dello stesso segno. Il meccanismo di separazione è basato sulla competizione per i siti di scambio tra gli ioni presenti nella fase mobile e quelli presenti nel campione. Si parla di *cromatografia di scambio ionico* (IEC)

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

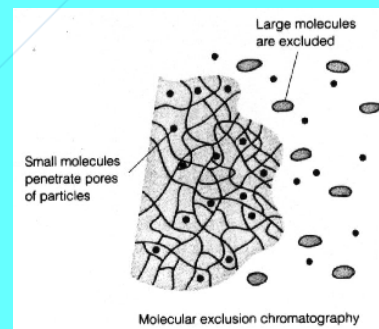


## Esclusione dimensionale

La fase stazionaria è un solido poroso o un gel. Le molecole dell'analita, disciolte nella fase mobile, penetrano nei pori se le loro dimensioni sono compatibili e vi rimangono per un certo tempo; le molecole più grandi sono invece escluse dai pori ed escono dalla colonna in tempi brevi

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

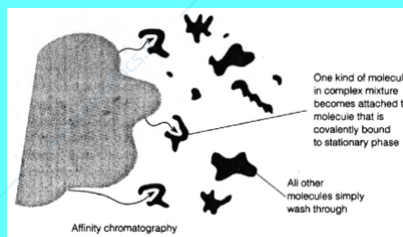
La tecnica è impiegata per la separazione di molecole di grandi dimensioni



## Affinità

In questo caso si utilizzano reazioni di tipo biochimico, reversibili e molto specifiche, in modo che le molecole da separare interagiscano con la fase stazionaria e si ottenga così l'eluizione selettiva di alcuni componenti della miscela. Si parla di *cromatografia di affinità* (AFC)

La cromatografia di affinità è impiegata nella separazione di molecole di interesse prevalentemente biochimico



## Principali tipi di cromatografie

TLC: scorrimento della fase liquida su un solido su strato sottile

GC: il campione in fase gassosa viene iniettato all'interno di una colonna sulle cui pareti sono presenti reagenti con i quali i diversi composti presenti nel campione si combinano.

HPLC: fase liquida ad alta pressione (il campione sciolto in fase liquida viene iniettato ad alta pressione nella colonna, i vari composti reagiscono con diverse velocità con i reagenti posti sulle pareti della colonna)

IC: ionica, la separazione avviene sulle specie ionizzate

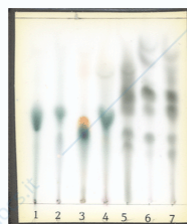
MS: spettroscopia di massa (separazione delle masse molecolari dei vari composti)



## Separazione di coloranti tessili

Nella figura è mostrata la separazione per TLC di coloranti rossi di uso tessile, provenienti da insetti

L'identificazione dei vari coloranti è possibile soltanto confrontando gli Rf di standard a composizione nota, ed è essenziale avere informazioni sul maggior numero possibile di sostanze. Infatti i coloranti tessili anticamente erano spesso impiegati in miscela: il colore risultante era ottenuto dal contributo di più sostanze coloranti. Inoltre possono essere presenti sostanze non colorate aventi altre funzioni (es. leganti, conservanti)



- 1 Dactylopius coccus (Costa, 1835); American Cochineal
- 2 Porphyrophora polonica (L. 1758); Polish Cochineal
- 3 Kermes vermilio (PLANCHON, 1864); Kermes
- 4 Porphyrophora hameli (BRAND, 1833); Armenian Cochineal
- 5 Kerria lacca (KEER, 1782); Lac Dye = Laccaic acids
- 6 Laccaic acid A (Main Dye) and other laccaic acids (Secondary dyes)
- 7 Mixture of laccaic acids made from Lac Dye

### TIPI DI An. Cromatografiche PIU' USATE IN AMBITO ARCHEOMETRICO, E APPLICAZIONI

• solo materiali organici (leganti: 1-2; solo pigmenti organici: 3; resine: 1-3)

Leganti	1. Thin layer chromatography (TLC)	Sostanze organiche come oli, proteine, cere
	2. Gas chromatography (GC)	Paint binders including oil, wax, <b>low-molecular-weight</b> resins
Pigmenti organici	2.1 <b>Pyrolysis</b> GC (PY-GC)	<b>High-molecular-weight</b> polymers, oils
	2.2 GC-mass spectrometry (GC-MS)	<b>Amino acids</b> in proteinaceous binders, <b>structural information</b> on organic materials (resins, oils, proteins, polysaccharides, dyes,...)
	3. High-performance liquid chromatography (HPLC)	Organic <b>dyes</b> (=coloranti, tinture)
	3.1 HPLC-MS	Synthetic organic <b>pigments</b> , natural and synthetic <b>low-molecular-weight</b> resins

## 1. CROMATOGRAFIA SU STRATO SOTTILE (TLC)

- è una evoluzione della cromatografia a colonna adoperata per separare i pigmenti delle piante dai primi del '900
- **fase mobile liquida** in cui è eluito il campione scorre su **fase stazionaria solida** (sostanza adsorbente solida, come allumina o silice, stesa su film sottile o vetro)
- entro in genere mezz'ora si è ottenuta una buona separazione delle sostanze di pesi molecolari diversi, per gravità o per elettroforesi => tempi/velocità di deposizione
- segue colorazione delle macchie (se prive di colore) con opportuno reagente
- standard di rif. simili fatti scorrere insieme per individuazione sostanze presenti

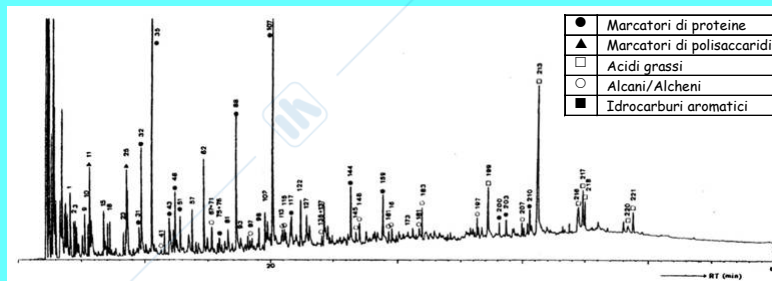
PRO: semplice ed economica (assai usata in biologia)

CONTRO: separazioni incomplete e **non** quantitativa

## Residui alimentari

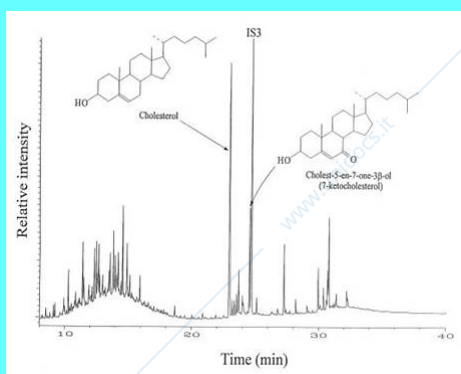
Un esempio di analisi GC-MS su un residuo alimentare prelevato in un sito romano è riportato di seguito. Nel cromatogramma si notano alcuni marcatori:

- pirrolo e toluene, marcatori per le proteine
- furano, marcatore per i carboidrati
- acidi organici, marcatori per grassi, cere e olii



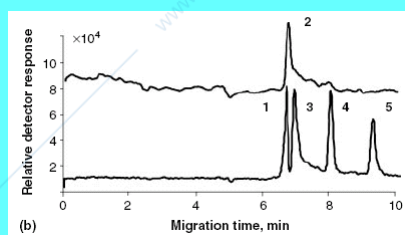
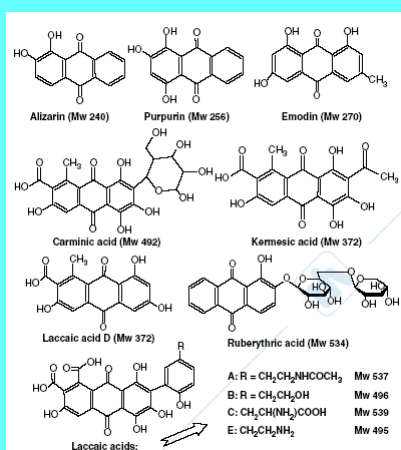
## Residui umani

Il cromatogramma mostra l'analisi GC-MS di un residuo di tibia umana risalente al IV-VI secolo d.C.: la presenza di colesterolo e del suo congenere 7-cheto-colesterolo sono indicatori di un processo degradativo avvenuto in condizioni ossidative



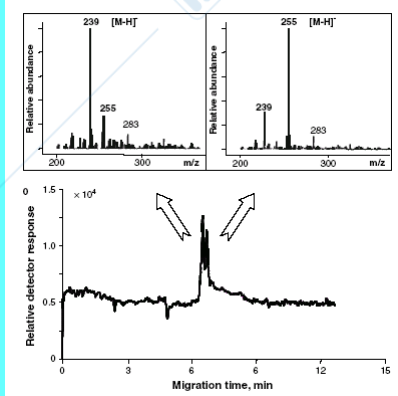
## Separazione di coloranti rossi

In questo esempio è separata per CZE-MS una miscela standard di coloranti rossi antrachinonici, composti che si trovano nelle lacche di origine animale o vegetale

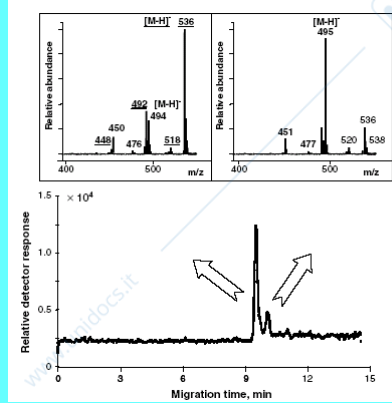


I picchi sono relativi a 1) alizarina (lacca di robbia), 2) emodina (dall'aloè), 3) purpurina (lacca di robbia), 4) acido carminico (cocciniglia), 5) acido laccaico (dal *Coccus laccae*)

## Estratti da lacche

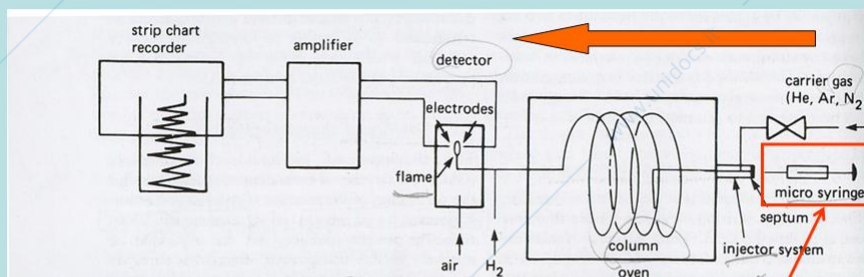


Estratto da lacca di robbia: si identificano l'alizarina (spettro di massa a sx) e la purpurina (dx)



Estratto da una lacca ignota: si identificano l'acido laccaico A (spettro di massa a sx) e l'acido laccaico B (dx)

## 2. GASCROMATOGRAFIA (GC)



**campione liquido,  
in soluzione,  
event. pre-trattato**

il rivelatore è tipicamente un riv. a fiamma di idrogeno, in cui si rilevano con opportuni elettrodi le variazioni di **conducibilità elettrica**: molto bassa nell'H, ma sensibilmente + alta nelle molecole organiche che bruciando si ionizzano e conducono elettricità => segnale elettrico amplificato e acquisito => **individuazione delle specie chimiche** rispetto a degli **standard** misurati in medesime cond. sperim.

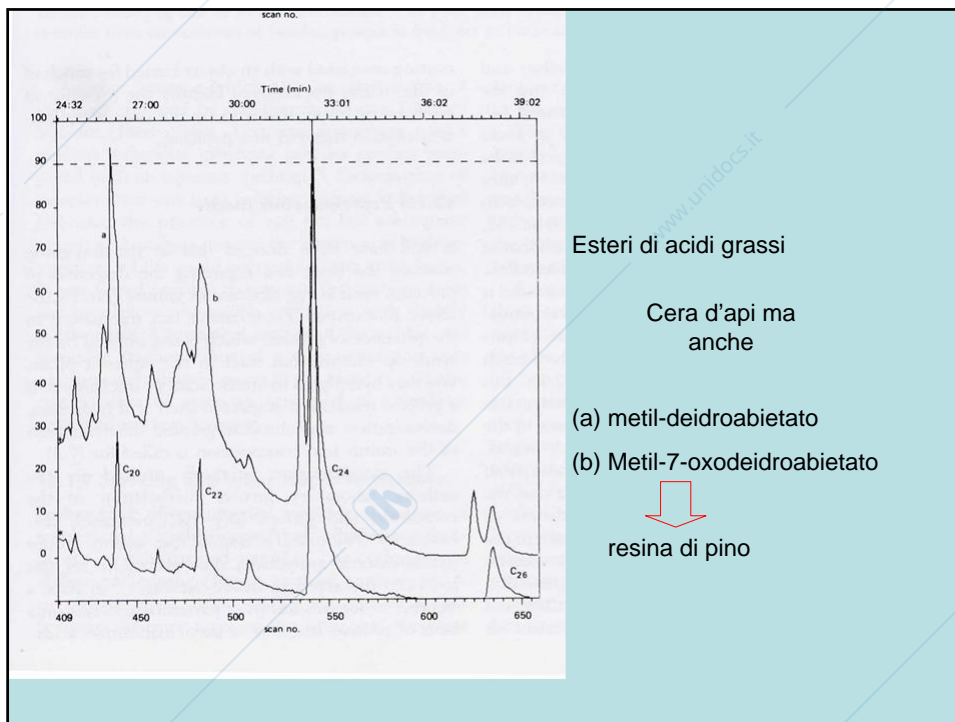
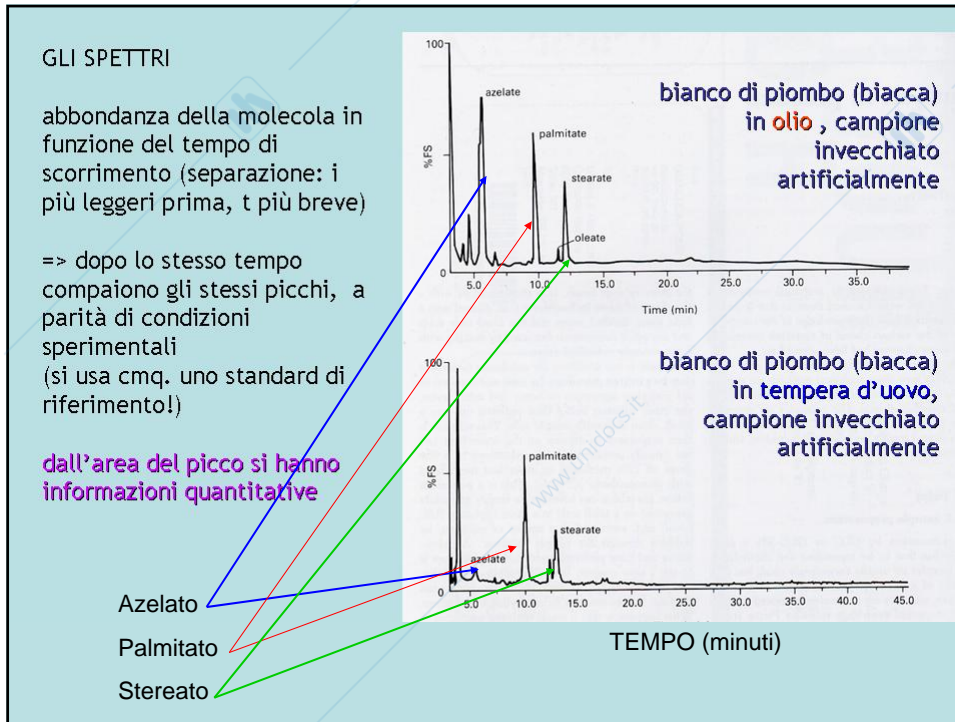




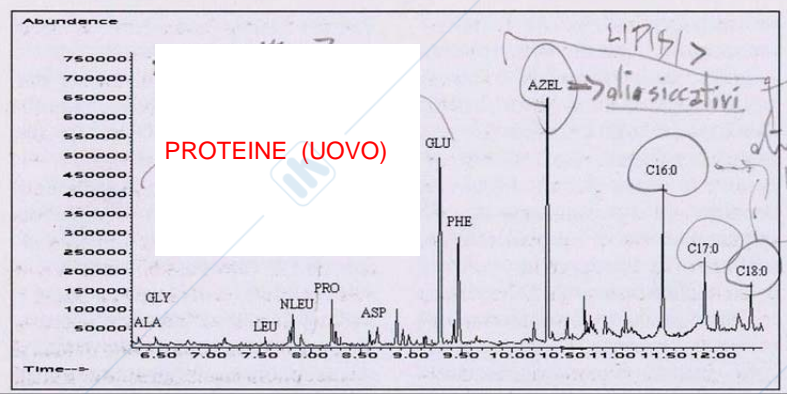
Figura 1. Cromatogramma GC/MS ottenuto dall'analisi del campione di strato pittorico prelevato dal cielo azzurro a sinistra del volto della Vergine del dipinto *Madonna degli alberetti*.

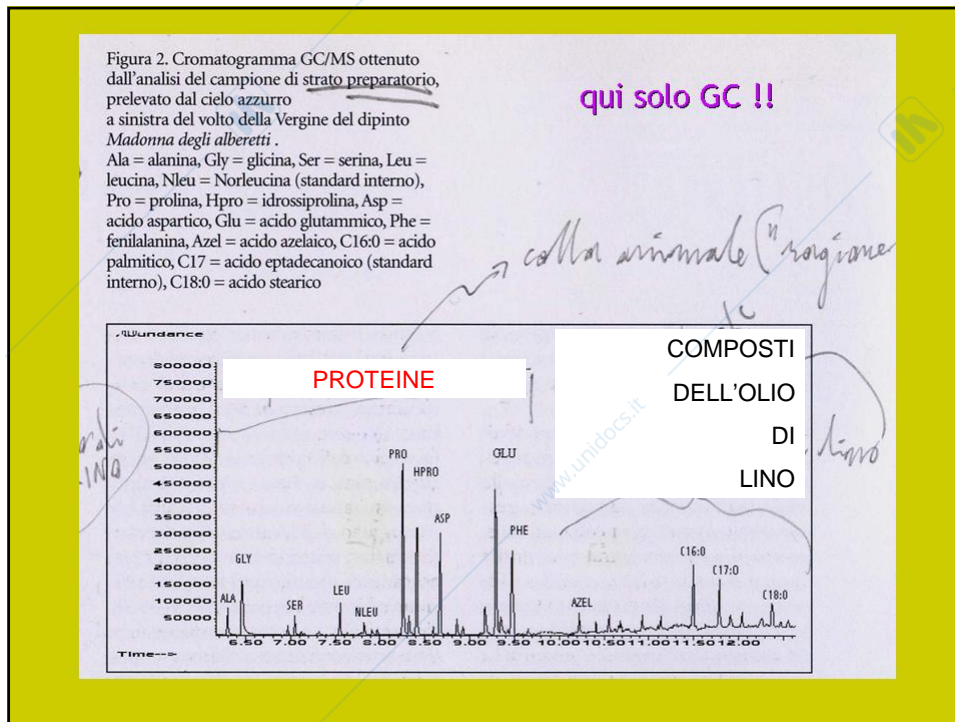
Ala = alanina, Gly = glicina, Leu = leucina, Nleu = Norleucina (standard interno), Pro = prolina, Asp = acido aspartico, Glu = acido glutammico, Phe = fenilalanina, Azel = acido azelaico, C16:0 = acido palmitico, C17 = acido eptadecanoico (standard interno), C18:0 = acido stearico

qui solo GC !!

AMINOACIDI (PROTEINE)

ACIDI GRASSI (LIPIDI)





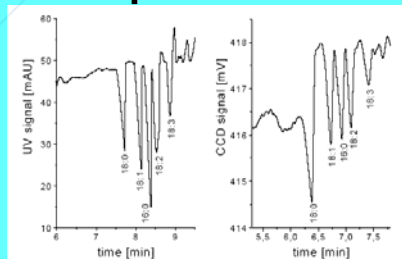
### 3. CROMATOGRAFIA LIQUIDA AD ALTA PERFORMANCE (HPLC)

- **fase mobile liquida (c.d. eluente) e fase stazionaria liquida ad alta pressione**
- **usata in genere per sostanze non gasificabili**
- **separa tra loro anche gli aminoacidi presenti e dai loro rapporti si identifica la proteina relativa**
- **anche qui: standard di rif. simili per individuazione certa (per confronto) delle sostanze**

## PRO vs. CONTRO

- precisione
- qualità e quantità di informazioni ottenibili
- preparazione del campione, scelta del supporto e dello/degli standard
- alti costi della strumentazione (GC-MS, HPLC) e delicatezza degli strumenti

## Separazione di acidi grassi

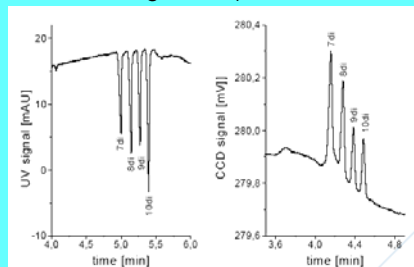


Separazione di acidi bicarbossilici, rivelazione UV (sx) e conducimetrica (dx); gli acidi sono, in ordine di eluizione, 1) pimelico 2) suberico, 3) azelaico, 4) sebacico

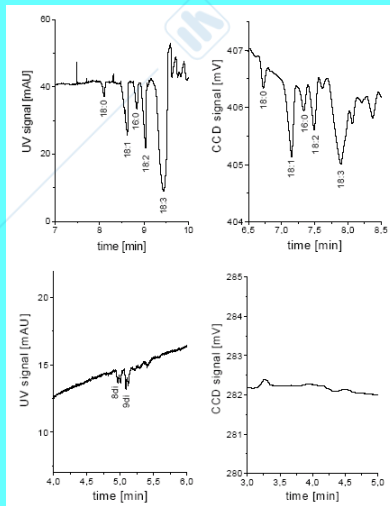
Gli acidi bicarbossilici si formano in conseguenza dell'invecchiamento degli oli siccativi

Separazione di acidi monocarbossilici, rivelazione UV (sx) e conducimetrica (dx); gli acidi sono, in ordine di eluizione, 1) stearico, 2) oleico, 3) palmitico, 4) linoleico, 5) linolenico

Gli acidi monocarbossilici sono presenti negli oli siccativi (formano esteri con la glicerina)

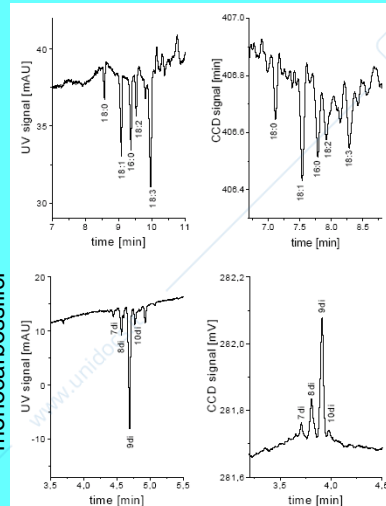


## Olio di lino



Olio di lino fresco: notare l'assenza di acidi dicarbossilici

acidi  
dicarbossilici  
monocarbossilici



Olio di lino invecchiato di consistenza gommosa: notare l'incremento di acidi dicarbossilici

### TECNICHE ANALITICHE ASSOCIATE

#### alla TLC:

- (densitometria = correlazione intensità del colore di ogni macchia con la quantità relativa di sostanza)
- **FTIR**, sul campione separato estratto dal supporto
- **MS**, sul campione separato estratto dal supporto

#### alla GC:

- **Gas-Pirolisi** = *pre-iniezione* si effettua una combustione rapida del composto organico ad alte T per ottenere composti più volatili
- **GC-FTIR** = spettrometro FTIR in cascata al cromatografo
- **GC-MS** = spettrometro di massa in cascata al cromatografo (più precisa ma più costosa della GC-FTIR)

#### alla HPLC:

- **HPLC-FTIR**, ossia FTIR in cascata
- **HPLC-MS**, ossia MS in cascata

## Accoppiamento GC-MS.

- Lo spettrometro di massa rappresenta il rivelatore ideale per la gascromatografia, perchè permette di analizzare in tempo reale i singoli picchi in uscita dalla colonna, effettuando sia un'analisi qualitativa che quantitativa, mediante il confronto dello spettro ottenuto con uno dei numerosi spettri memorizzati nella banca dati.

## Cromatogramma con rivelatore MS

L'informazione che si ottiene dal rivelatore a spettrometria di massa può essere gestita in modi diversi:

- nella modalità TIC (Total Ion Current) si misura, in ogni istante della corsa cromatografica, la *corrente ionica totale* generata dai vari ioni che si formano dal soluto in quell'istante
- nella modalità SIM (Single Ion Monitoring) si misura il segnale a  $m/z$  fissa; il cromatogramma che si ottiene indica la presenza soltanto dei soluti dai quali si genera un frammento avente quel valore di  $m/z$
- in ogni istante del cromatogramma è inoltre possibile avere lo spettro di massa di ciò che sta passando in quel momento nello spettrometro di massa

# MS

## la spettrometria di massa

### SPETTROMETRIA DI MASSA

- **NON** è una tecnica di “spettroscopia ottica”, ossia non si basa su transizioni energetiche atomiche o molecolari a qualche lunghezza d’onda
- uno *spettrometro di massa* è strumento in grado di trasformare molecole in ioni, quindi di misurare il rapporto massa su carica ( $m/q$ ) delle singole specie ioniche ottenute
- misure qualitative e quantitative
- **DISTRUTTIVA** : campione vaporizzato

## PRINCIPIO FISICO

1. (sostanza in camera ad alto vuoto dove) campione vaporizzato e bombardato con **elettroni ad alta Energia** che espellono un elettrone dalla molecola  $M$ , trasformandola in un radicale catione (o ione molecolare,  $M^{+\bullet}$ ) :

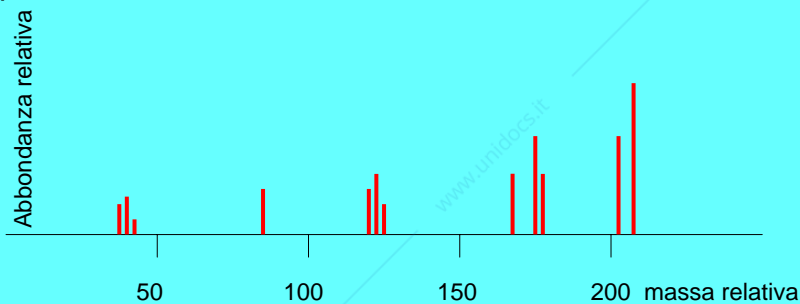


ad es. dal metanolo si forma:



2. il fascio di ioni passa tra i poli di un **elettromagnete** in cui viene deviato: a parità di carica l'entità della deviazione dipende dalla massa dello ione.
3. La massa di  $M^{+\bullet}$  misurata è pressoché identica a quella di  $M$ , indi misurando  $M^{+\bullet}$  è come si misurasse la massa della molecola  $M$ , ossia si identificasse proprio  $M$ , che è quel che interessa. In questo senso nella MS si misurano i pesi molecolari.

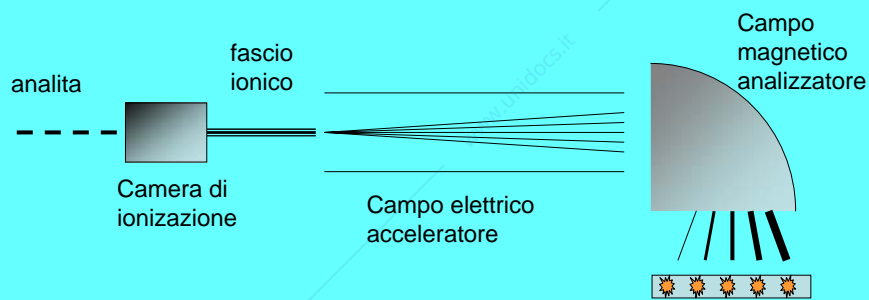
- Lo spettro (così chiamato solo perché è a righe, non perché si tratti di una spettroscopia) ottenuto consente, dall'identificazione dei frammenti in base alla loro massa atomica, di ricostruire la formula della molecola presente. Molto più semplicemente, negli strumenti moderni lo spettro viene confrontato dal computer con i numerosi spettri memorizzati nella banca dati.



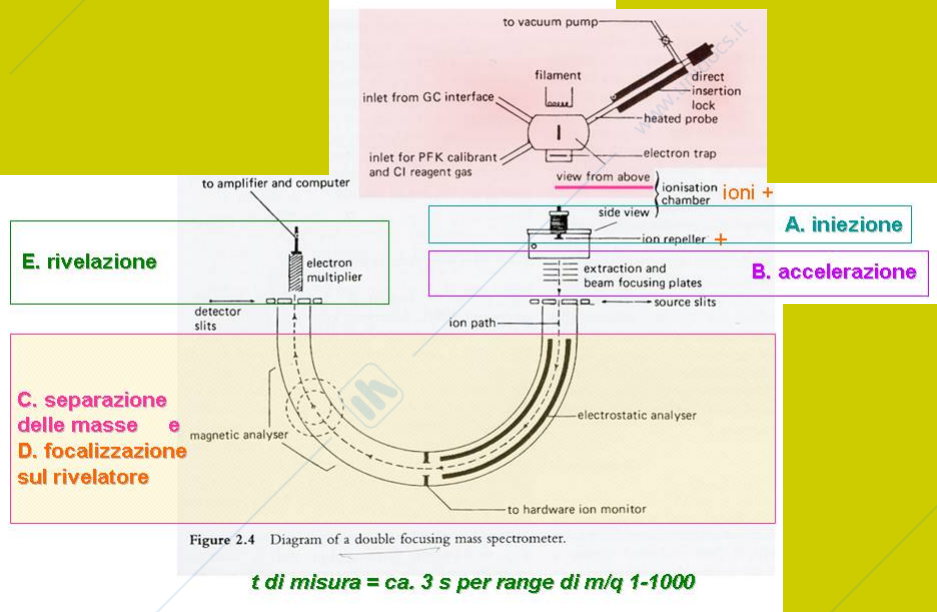
## GLI SPETTRI

- lo spettro dà l'abbondanza relativa dello ione in funzione del rapporto  $m/q$  (anche detto  $m/z$ )
- è dal rapporto  $m/q$  che si deduce lo ione molecolare, e quindi la molecola, presente
- in genere  $q=1$  (ione +, un solo e<sup>-</sup> estratto) =>  $m$ =massa molecolare => individuo la molecola

- In uno spettrometro di massa il campione viene portato in fase gassosa e le molecole vengono frammentate per bombardamento con elettroni.
- Gli ioni che si formano, accelerati da un campo elettrico posto in un campo magnetico, percorrono traiettorie diverse secondo il rispettivo rapporto carica/massa e perciò si separano tra di loro.

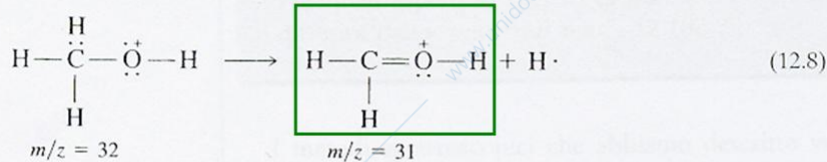


## GLI SPETTROMETRI



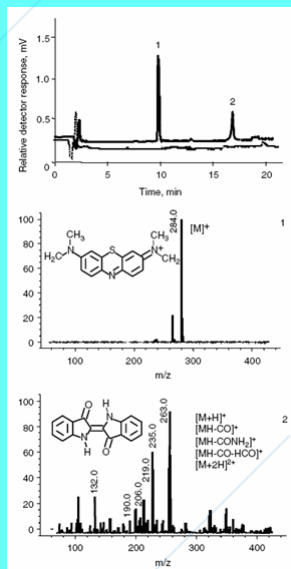
## della presenza di ioni figli (o di frammentazione), l'es. del metanolo: lo ione a $M^+ - 1$

Se gli elettroni che bombardano hanno energia sufficiente, provocano non solo la formazione dello ione molecolare (genitore), ma anche di ioni di frammentazione, detti **ioni figli**: lo ione molecolare originale si scinde in frammenti più piccoli, alcuni dei quali sono ionizzati e vengono selezionati dallo spettrometro in base al rapporto  $m/z$ . Un picco appariscente nello spettro di massa del metanolo, ad esempio, è quello a  $M^+ - 1$ ,  $m/z$  31. Questo picco è dovuto alla perdita di un atomo di idrogeno da parte dello ione molecolare:



Lo ione figlio non è altro che la formaldeide in forma protonata, ossia un carbocatione stabilizzato dalla risonanza.

## Coloranti per arazzi



In alto è riportato il cromatogramma ottenuto analizzando un estratto da una fibra blu di un arazzo giapponese del XIX secolo, con rivelatore UV-vis a 620 nm. Il picco a 17 minuti (1) è dovuto all'indaco ma il picco a 10 minuti (2) è incognito ed è identificato soltanto impiegando il rivelatore **MS**, dal cui spettro risulta essere il composto blu di metilene

## GC-MS

## GC-MS

- la MS viene messa in cascata rispetto alla GC, in modo da sfruttare immediatamente ogni sostanza volatilizzata e già analizzata dalla GC => aumenta la precisione dell'analisi GC, offrendo ulteriori informazioni sulle molecole riconosciute
- costi strumentali alti (>100.000 euro)

