

1222·2022
800
ANNI



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA



ANALISI DEI MEDICINALI

Prof. Valentina Gandin

AA 2023-24

1222 • 2022
800
ANNI



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

Analisi dei Medicinali

ISOLAMENTO DELLA SOSTANZA DA UNA MISCELA

CROMATOGRAFIA

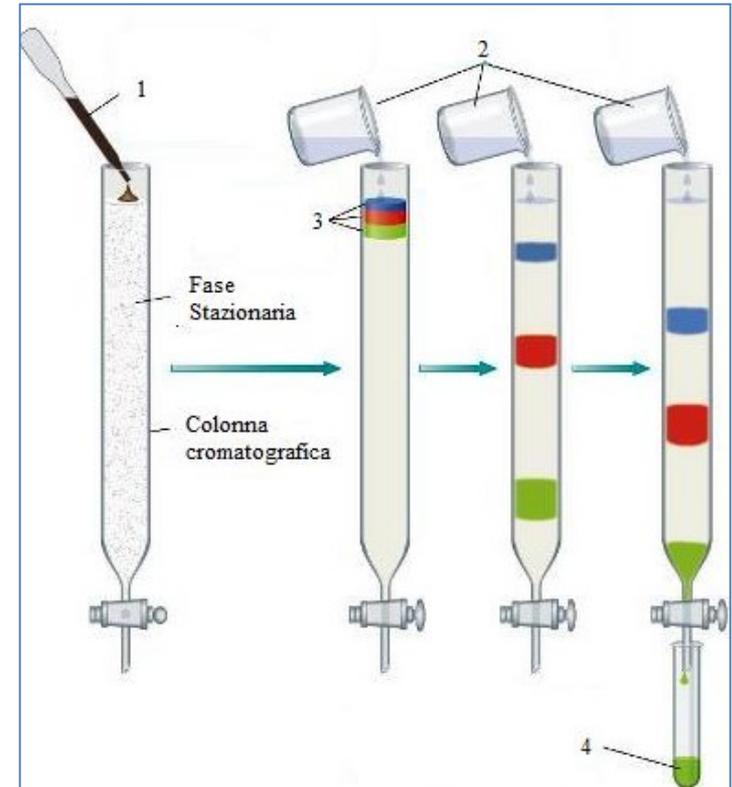
ISOLAMENTO DELLA SOSTANZA DA UNA MISCELA

CROMATOGRAFIA

DEFINIZIONE IUPAC (<https://goldbook.iupac.org>)

chromatography

A physical method of separation in which the components to be separated are distributed between two phases, one of which is stationary (stationary phase) while the other (the mobile phase) moves in a definite direction.

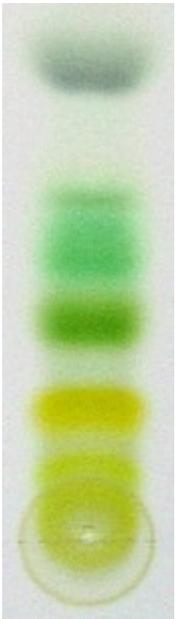


CROMATOGRAFIA

Nascita della cromatografia

Inventata dal botanico russo Mikhail Semenovich Tswett.

(inizio XX sec) come tecnica per la separazione di pigmenti fogliari



cromatografia:

dal greco “scrittura del colore”

CROMATOGRAFIA

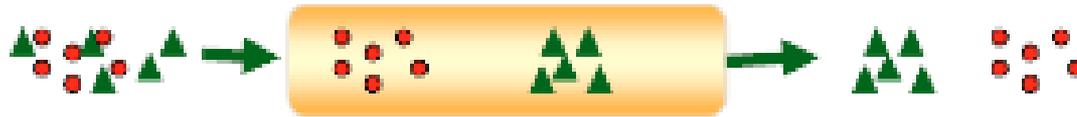
In una **separazione cromatografica** i composti contenuti in una miscela vengono separati in funzione della loro **differente affinità per due fasi**:

- una fase fissa, **o fase stazionaria**, FS, che può essere un solido o un liquido supportato su solido (ossido di silicio, ossido di alluminio, cellulosa ecc ecc...)
- **una fase mobile**, FM, liquida o gassosa, che viene fatta fluire in continuo sulla fase stazionaria

CROMATOGRAFIA

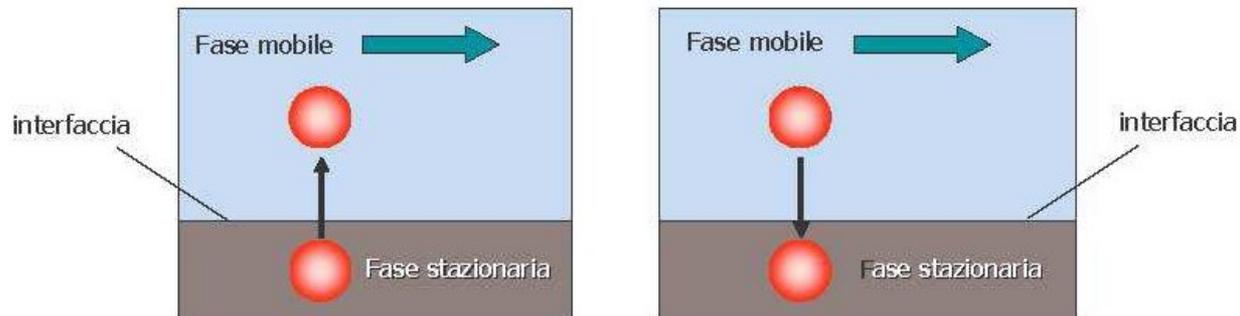
I metodi cromatografici sfruttano la **diversa affinità** delle molecole nei confronti di due fasi diverse.

La fase stazionaria (FS) è immobilizzata, mentre la fase mobile (FM) è fatta scorrere in modo continuo sulla FS: composti che hanno **maggiore affinità per la FS rimarranno ancorati a questa** mentre i composti che hanno **maggiore affinità con la FM si muoveranno con essa**.



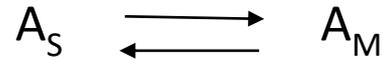
CROMATOGRAFIA

In ogni istante si verifica una **COMPETIZIONE** tra la fase mobile (FM) e la sostanza eluita per la fase stazionaria (FS): **distribuzione caratteristica**



Processo dinamico di trasferimento tra le due fasi.

CROMATOGRAFIA

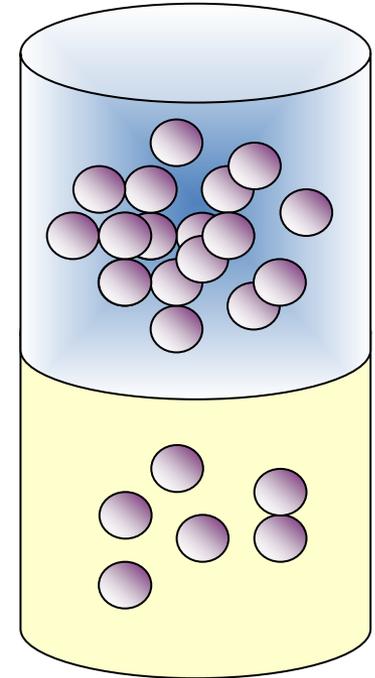


rapporto di distribuzione, o rapporto di ripartizione
o **coefficiente di ripartizione**

$$K = \frac{[A_S]}{[A_M]}$$

$[A_S]$ = conc di A nella FS

$[A_M]$ = conc di A nella FM



dipende da: natura di FS e FM e dalla T di lavoro

CROMATOGRAFIA

In cromatografia le **fasi stazionarie DEVONO** rispondere a determinate caratteristiche:

- **Non devono reagire** con il soluto né catalizzare reazioni di decomposizione, polimerizzazione o idrolisi.
- **Non devono legare** irreversibilmente il soluto.
- **Non devono solubilizzarsi** nella fase mobile né **reagire** in alcun modo con essa.
- **Devono essere in grado di adsorbire un gran numero di sostanze** in maniera selettiva, riproducibile e senza dar luogo a fenomeni di saturazione.
- **Devono permettere un facile percolamento** dell'eluente.

CROMATOGRAFIA

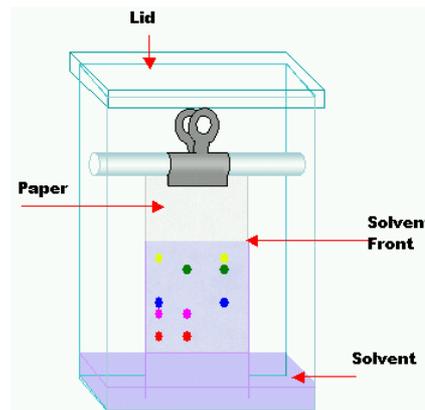
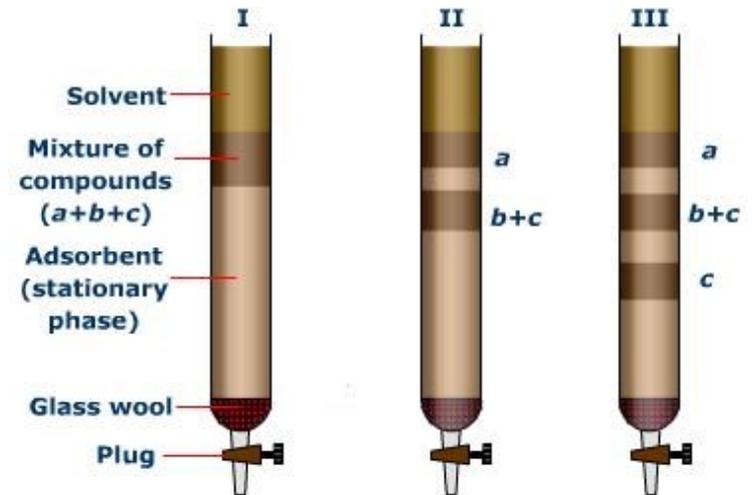
In cromatografia le **fasi mobili** (eluenti) **DEVONO** rispondere a determinate caratteristiche:

- **Non devono reagire** con il soluto né catalizzare reazioni di decomposizione, polimerizzazione o idrolisi.
- **Devono far migrare** i componenti della miscela da separare.
- **Non devono solubilizzare** la fase stazionaria **né reagire** in alcun modo con essa.
- **Devono avere un basso punto di ebollizione** così da permettere un facile recupero dei soluti per evaporazione dopo separazione.
- **Non devono contenere composti tossici e devono avere costi contenuti.**

CROMATOGRAFIA

Classificazione delle tecniche cromatografiche

- Tipo (stato fisico) di FM
- Tecnica di eluizione
- Meccanismo di separazione



CROMATOGRAFIA

Classificazione delle tecniche cromatografiche

In base allo **STATO FISICO** della FM:

liquido

CROMATOGRAFIA LIQUIDA (LC)

LSC: cromatografia
liquido/solido

LLC: cromatografia
liquido/liquido

gas

GASCROMATOGRAFIA (GC)

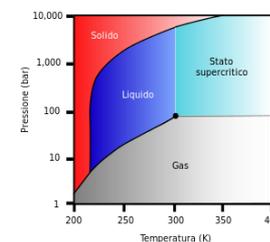
GSC: cromatografia
gas/solido

GLC: cromatografia
gas/liquido

fluido supercritico

CO₂

CROMATOGRAFIA in FASE SUPERCRITICA (SFC)



CROMATOGRAFIA

Classificazione delle tecniche cromatografiche

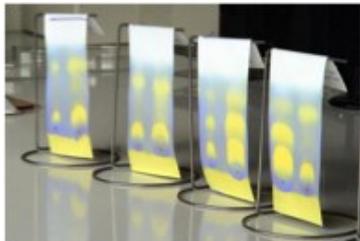
In base alla **TECNICA di ELUIZIONE:**

su colonna



Principalmente
per analisi
**PREPARATIVA O
QUANTITATIVA**
(ma anche
QUALITATIVA)

planare



PAPER CHROMATOGRAPHY (PC)

Principalmente per analisi **QUALITATIVA**
(poco **PREPARATIVA**)

**THIN LAYER
CHROMATOGRAPHY (TLC)**



CROMATOGRAFIA

Classificazione delle tecniche cromatografiche

In base al MECCANISMO (principale) di SEPARAZIONE:

- **Adsorbimento (FASE STAZIONARIA SOLIDA)**
- **Ripartizione (FASE STAZIONARIA LIQUIDA/SOLIDA)**
- **Scambio ionico (FASE STAZIONARIA RESINA A SCAMBIO IONICO)**
- **Esclusione (FASE STAZIONARIA CON PORI DI DIMENSIONE DEFINITA)**
- **Affinità (FASE STAZIONARIA SPECIFICAMENTE FUNZIONALIZZATA)**

CROMATOGRAFIA

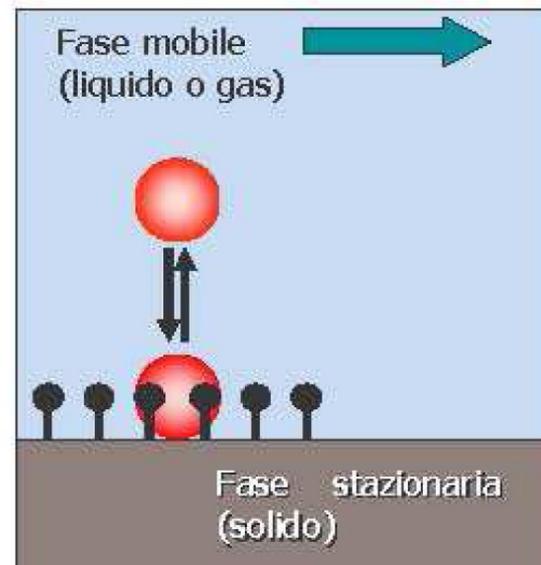
Cromatografia di Adsorbimento

Interazione tra soluto e siti attivi dell'adsorbente solido usato come FS.



aumento della concentrazione del soluto sulla superficie di separazione tra le due fasi.

FS= solida
FM= liquido o gas



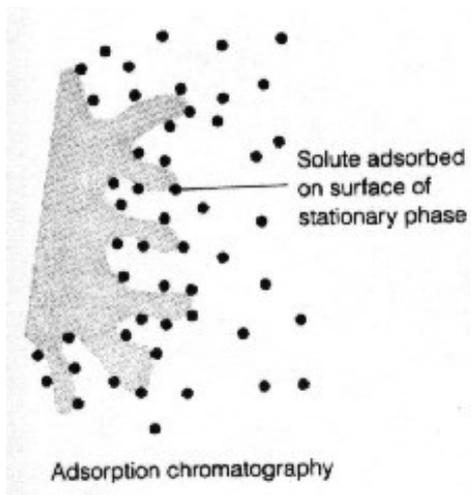
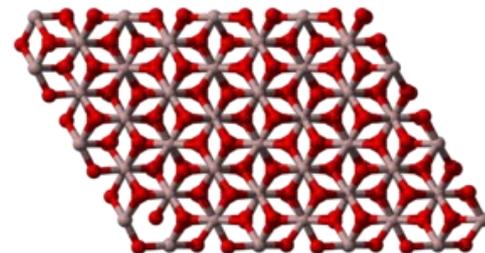
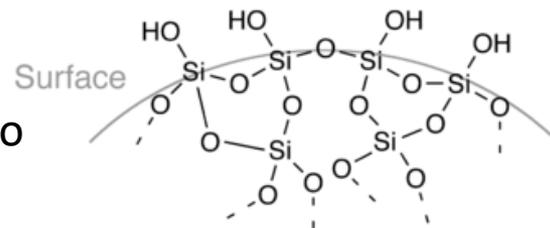
ATTENZIONE! Assorbimento \neq Adsorbimento

CROMATOGRAFIA

Cromatografia di Adsorbimento

La fase stazionaria è un solido in polvere, es gel di silice (polimero del diossido di silicio) o allumina (ossido di alluminio, Al_2O_3)

Sulla superficie dei granuli si trovano siti attivi (-OH) che possono stabilire interazioni reversibili (**legami H, forze di Van der Waals, interazioni dipolari...**) con le molecole della miscela da separare (ma anche con le molecole d'acqua, disattivandolo).



E' usata per separare **sostanze neutre, polari o non polari di natura organica o inorganica**.
Comunemente utilizzata in **analisi qualitativa e separazioni preparative** dato il **basso costo delle fasi stazionarie**.

CROMATOGRAFIA

Cromatografia di Adsorbimento

Poiché l'**adsorbimento** è un fenomeno superficiale è importante che **la fase stazionaria abbia le seguenti caratteristiche:**

- 1. Una elevata estensione superficiale** che favorisca il rapido instaurarsi dell'equilibrio tra la fase stazionaria e quella mobile.
- 2. Particelle con una granulometria uniforme** al fine di rendere più efficaci e riproducibili i fenomeni di adsorbimento.

La granulometria è espressa oltre che dalle dimensioni delle particelle (0,2 - 0,3 mm) anche in termini di intervalli di mesh, unità di derivazione anglosassone che rappresenta il numero di maglie per pollice lineare (2,54 cm) di un setaccio: ad es. un setaccio da 70 mesh contiene per ogni pollice lineare 70 maglie. Più elevato è il numero di mesh, minori sono le dimensioni delle particelle di fase stazionaria e più efficace è il processo separativo.

CROMATOGRAFIA

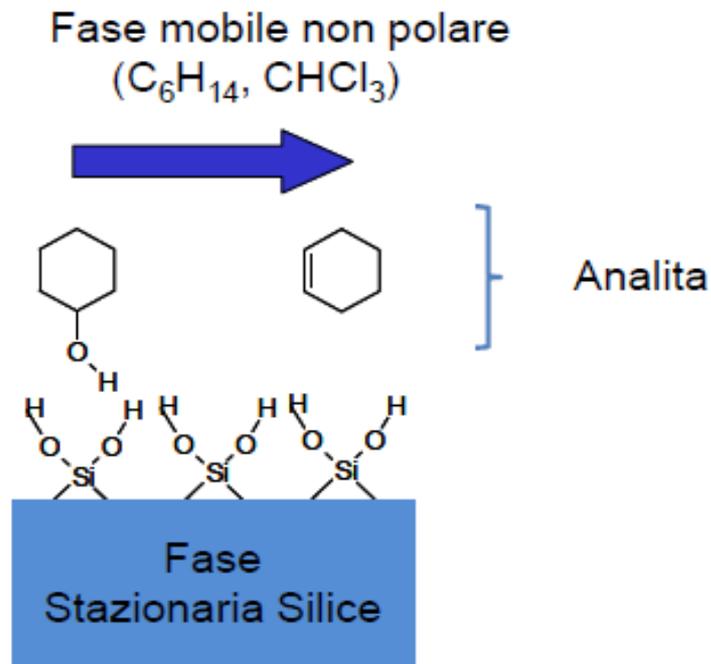
Cromatografia di Adsorbimento

Le fasi mobili più usate in ordine di polarità crescente e quindi di potere eluente sono:

Esano, isottano, cloroformio, acetonitrile, metanolo, acqua.

Cromatografia liquido/solido (LSC)
FS: gel di silice (SiO_2)_n

Esempio



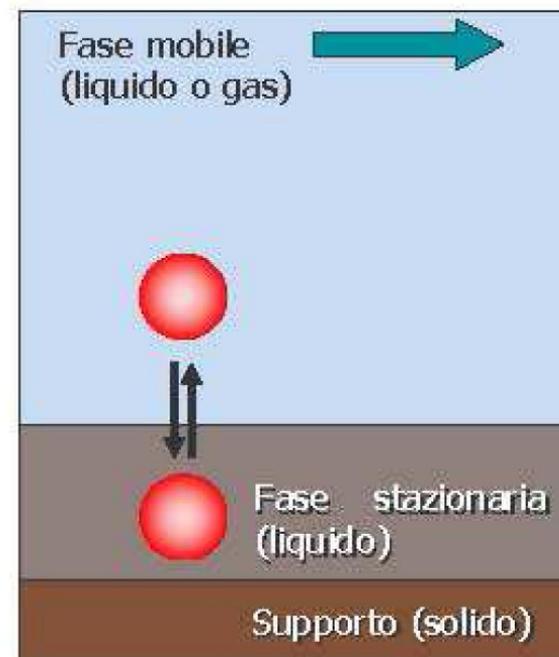
CROMATOGRAFIA

Cromatografia di Ripartizione

La FS è un liquido supportato da un solido inerte, a formare un film liquido.

Il soluto si solubilizza nelle **due fasi immiscibili** e si ripartisce secondo il suo coefficiente di ripartizione in ciascuna di esse.

- *Liquid Liquid Chromatography (LLC)*
- *Gas Liquid Chromatography (GLC)*

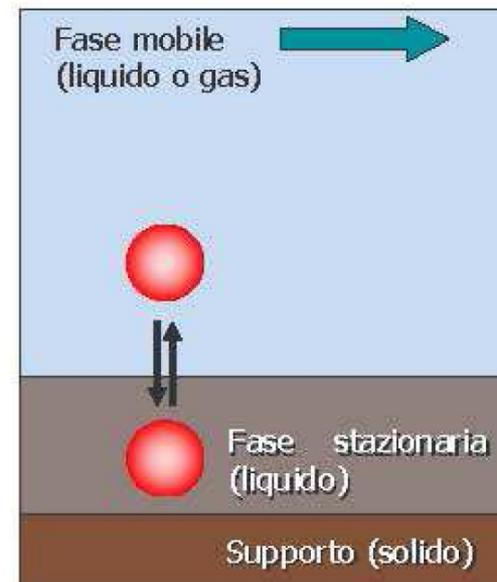


CROMATOGRAFIA

Cromatografia di Ripartizione

Cromatografia di ripartizione in fase normale: la FS è più polare della FM.

Cromatografia di ripartizione in fase inversa: la FS è meno polare della FM. Più comunemente impiegata per la separazione di sostanze organiche in analisi quantitativa e qualitativa.



Spesso, il liquido di ripartizione è legato chimicamente al supporto solido inerte, che di solito è rappresentato da silice, per derivatizzazione dei gruppi ossidrilici superficiali.

CROMATOGRAFIA

In fase normale

Fase stazionaria polare



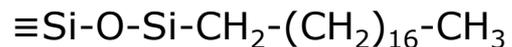
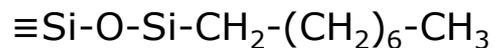
Fase mobile a bassa polarità

Solventi organici

(zuccheri, steroidi, amminoacidi,
proteine e peptidi)

In fase inversa

Fase stazionaria apolare



Fase mobile molto polare

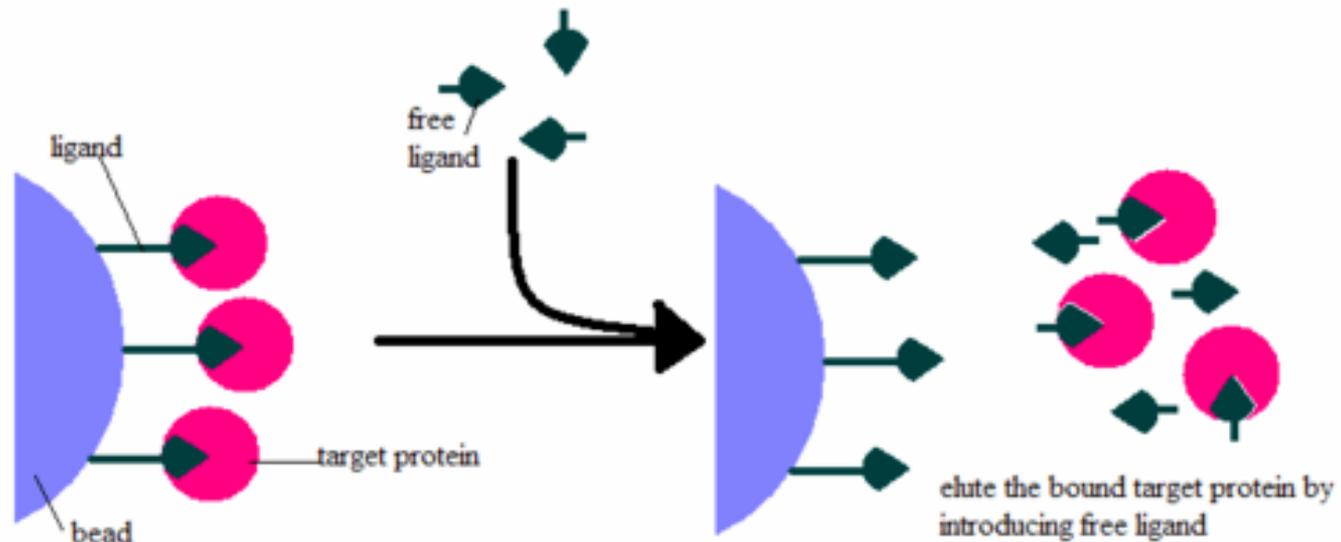
Soluzioni acquose o tamponate

Miscela acqua/metanolo/acetone
(ammine, vitamine, idrocarburi, analgesici)

CROMATOGRAFIA

Cromatografia di affinità (AFC)

Si basa su reazioni di tipo biochimico, reversibili e molto specifiche, in modo che le molecole da separare interagiscano con la fase stazionaria a cui è chimicamente legato un componente (*ligando*) *specifico* così da ottenere l'eluizione selettiva di alcuni componenti della miscela.



FS solida – ligando immobilizzato
FM liquida

CROMATOGRAFIA

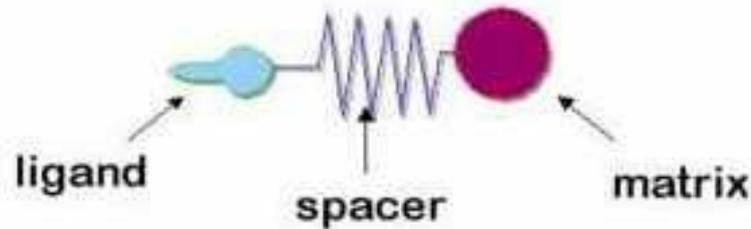
Cromatografia di affinità (AFC)

- Tecnica di purificazione di campioni complessi utilizzata principalmente per proteine e altre biomolecole.
- Sfrutta interazioni specifiche tra queste molecole e un ligando immobilizzato sulla fase stazionaria. L'interazione tra proteina e ligando deve essere specifica per la proteina che vogliamo separare e abbastanza forte.
- Le altre proteine della soluzione vengono eluite attraverso la colonna in quanto non sono in grado di interagire con il ligando.
- C'è bisogno (quasi sempre) di uno spiazzante esterno per separare l'analita dalla FS, occorre quindi una modifica della fase FM.

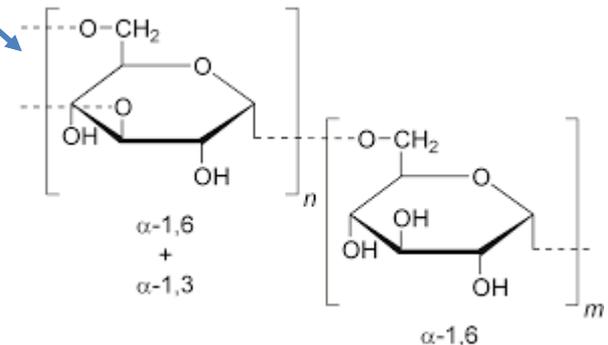
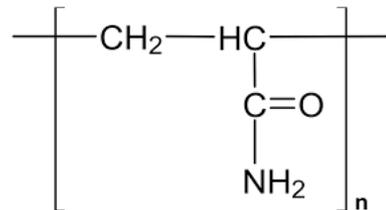
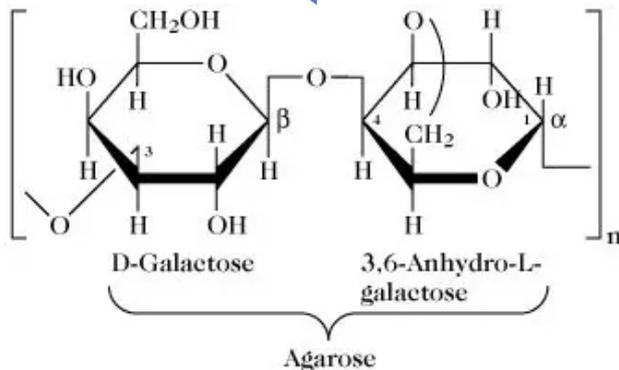
CROMATOGRAFIA

Cromatografia di affinità (AFC)

FS



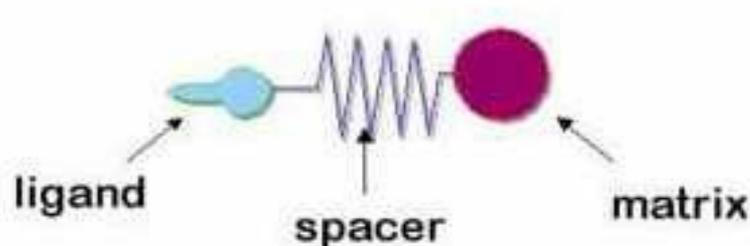
Le matrici più utilizzate sono i destrani (polimeri ramificati del glucosio, Sephacryl S), agarosio (polimero polisaccaride purificato dall'agar-agar, Sepharose, Bio-Gel A), poliacrilammide (Bio-Gel P), cellulosa.



CROMATOGRAFIA

Cromatografia di affinità (AFC)

FS



LA MATRICE

La matrice è il materiale che viene utilizzato per fornire un supporto alla fase stazionaria

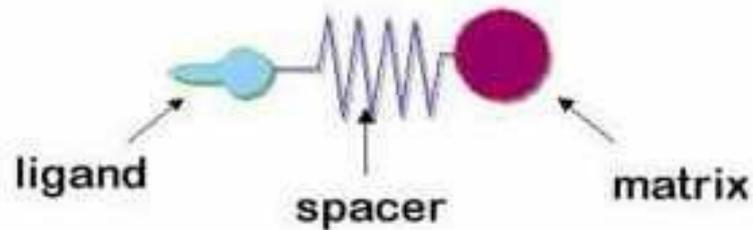
CARATTERISTICHE GENERALI

- Elevata stabilità meccanica
- Presenza di gruppi funzionali
- Elevata capacità
- Pori di dimensioni e forma controllata
- Superficie inerte per ridurre l'assorbimento non selettivo degli analiti

CROMATOGRAFIA

Cromatografia di affinità (AFC)

FS

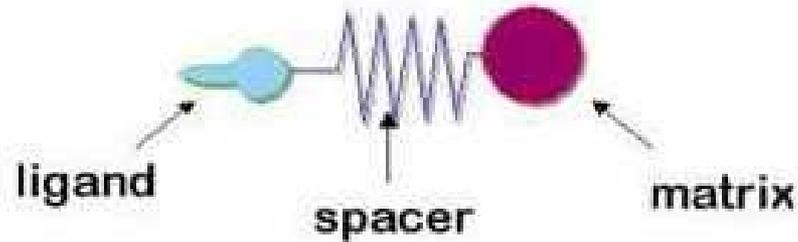


Per evitare che il legame del ligando alla matrice possa interferire con la sua capacità di legarsi poi alla macromolecola, è preferibile interporre un braccio spaziatore. La sua lunghezza è critica per l'efficienza della cromatografia (la lunghezza ottimale è tra 6 e 8 atomi di carbonio).

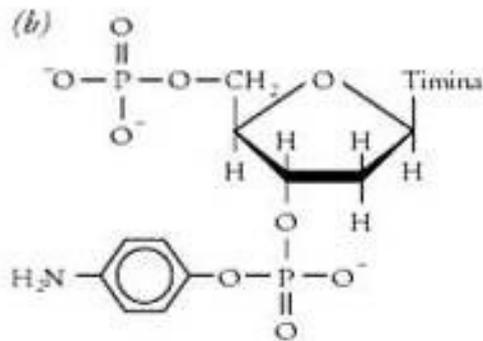
CROMATOGRAFIA

Cromatografia di affinità (AFC)

FS



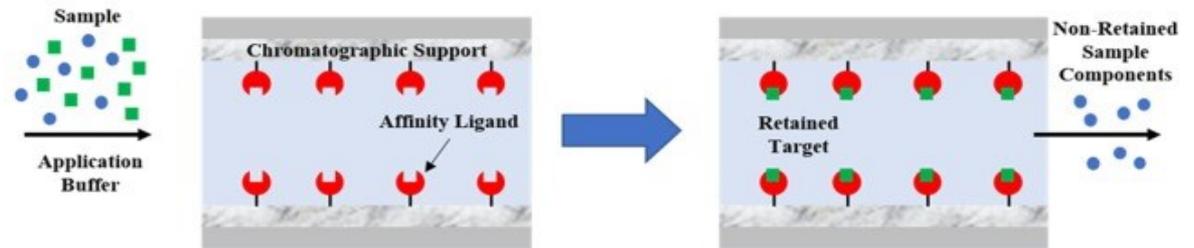
Ligando può essere una piccola molecola, un peptide, una proteina, un metallo, RNA/DNA, ecc.



per purificare una ribonucleasi

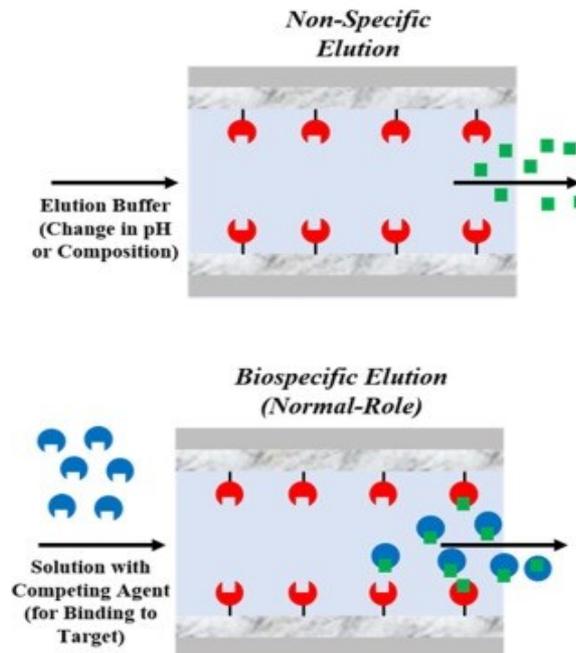
CROMATOGRAFIA

(a) Application of Target and Sample onto Affinity Column



Cromatografia di
affinità (AFC)

(b) Methods for Elution of Retained Target



CROMATOGRAFIA

Cromatografia di affinità (AFC)

VANTAGGI

- Possibilità di caricare grandi volumi
- Elevata specificità di selezione

SVANTAGGI

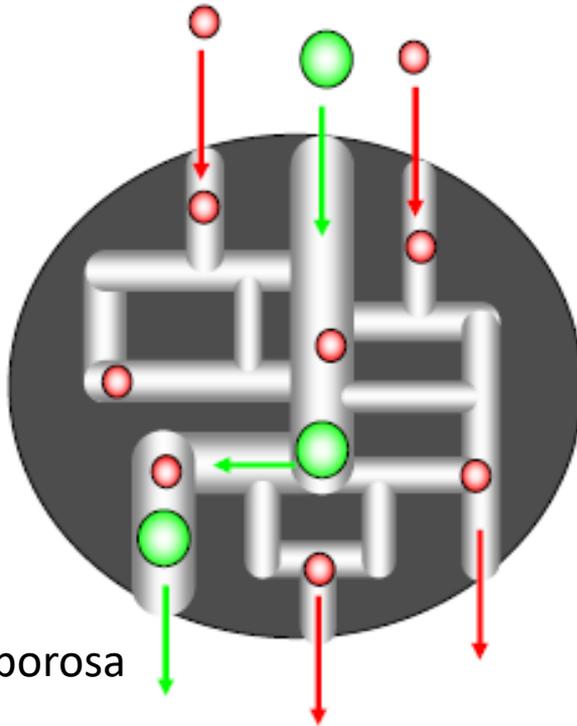
- Esecuzione in più tempi
- Richiesta conoscenza delle caratteristiche della molecola da selezionare (meccanismo d'azione, affinità per altri ligandi...)
- In molti casi il campione eluito è contaminato dall'agente "spiazzante"

CROMATOGRAFIA

Cromatografia di esclusione (EC)

Separazione basata sulla dimensione molecolare

Cromatografia di esclusione dimensionale (SEC)



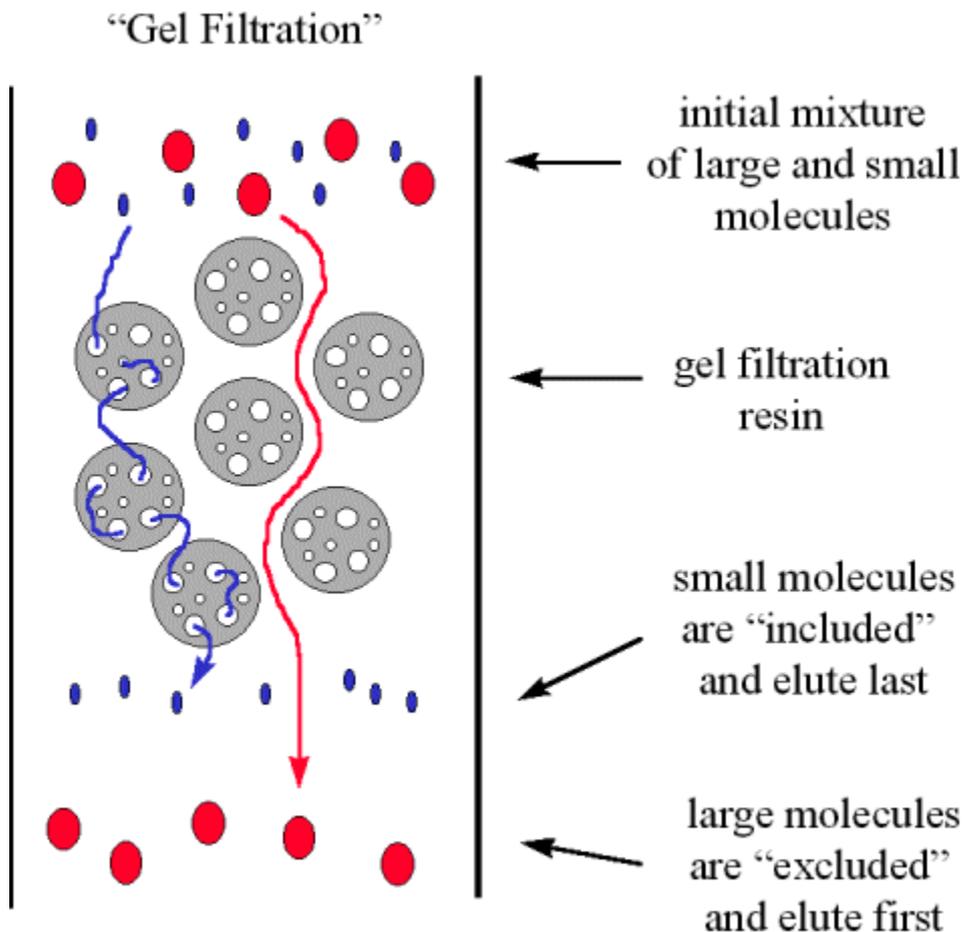
FS solida – porosa
FM liquida

Nessuna interazione chimica tra le particelle di resina, che fungono da setacci molecolari.

CROMATOGRAFIA

Cromatografia di esclusione dimensionale (SEC)

- **Gel permeazione (GPC)** per la separazione di sostanze insolubili in acqua
- **Gel filtrazione (GFC)** per la separazione di sostanze solubili in acqua. La tecnica è impiegata per la separazione di molecole di grandi dimensioni (peptidi, proteine, polimeri)



CROMATOGRAFIA

Cromatografia di esclusione dimensionale (SEC)

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

CROMATOGRAFIA

Cromatografia di esclusione dimensionale (SEC)

VANTAGGI

- Semplice nell'esecuzione
- Prevedibile
- Eluizione nel tampone di partenza

SVANTAGGI

- Bassa capacità (piccoli volumi, 1/40 del volume della colonna)
- Sovrapposizione dei picchi
- Diluizione del campione

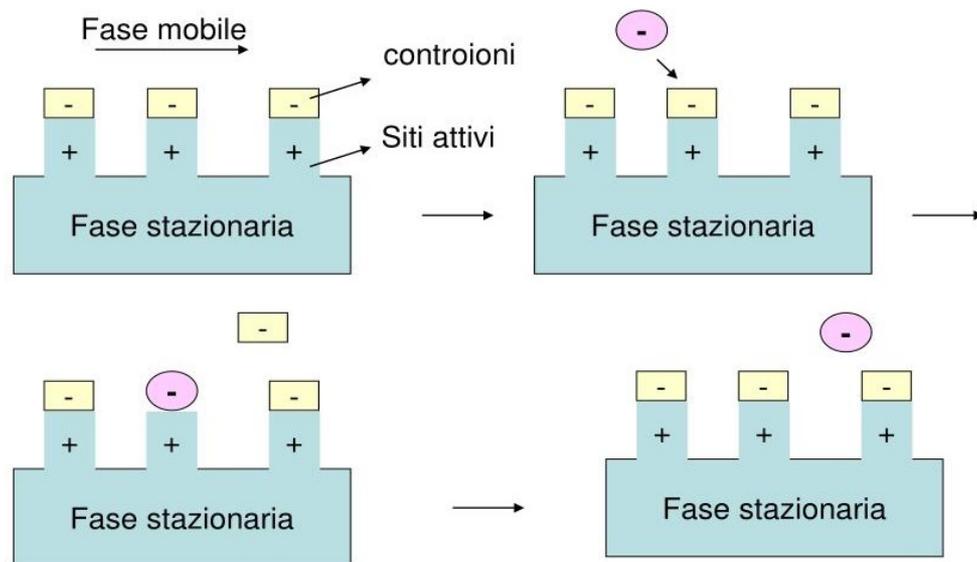
CROMATOGRAFIA

Cromatografia a Scambio Ionico (IEC)

Si basa su **interazioni di tipo elettrostatico** tra ioni in FM e FS.

La FS è costituita da un polimero inerte (resine sintetiche) contenente siti attivi ionizzati o ionizzabili (gruppi funzionali acidi o basici), i cui contro-ioni possono essere scambiati con altri ioni aventi carica dello stesso segno.

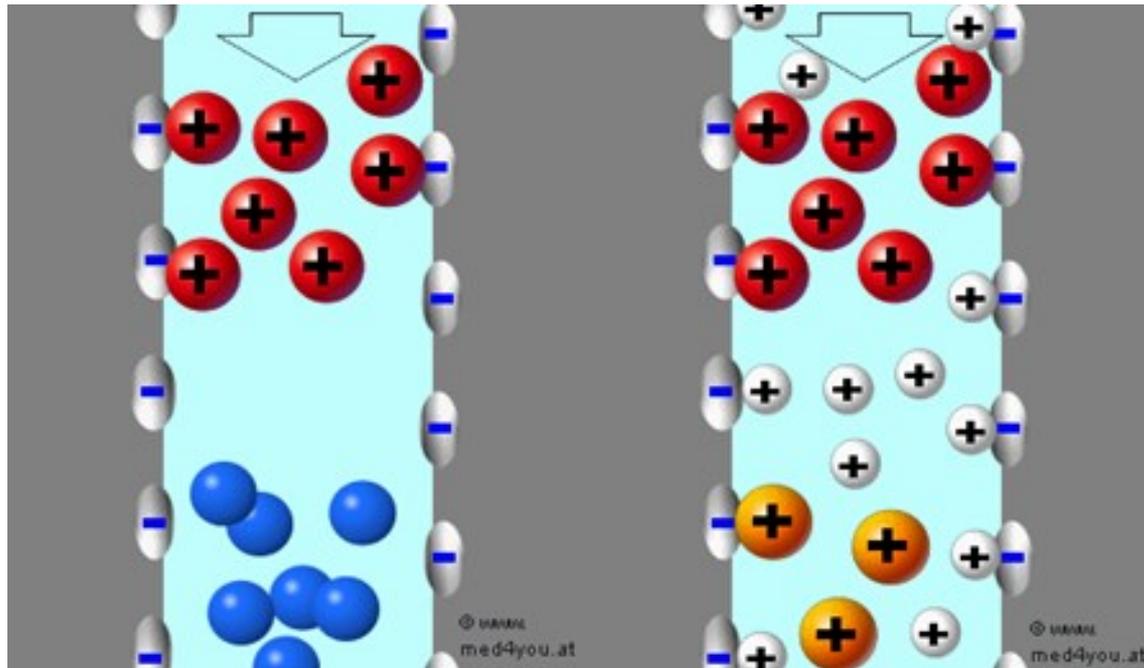
E' impiegata per la separazione di **sostanze ioniche** o **ionizzabili**.



CROMATOGRAFIA

Cromatografia a Scambio Ionico (IEC)

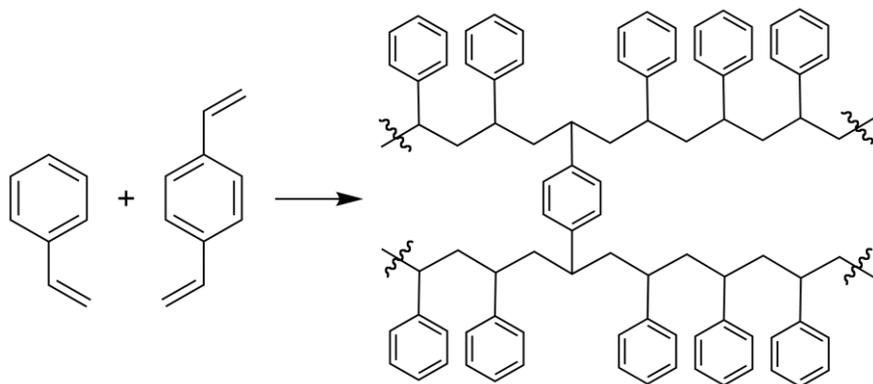
Il meccanismo di separazione è basato sulla competizione per i siti di scambio tra gli ioni presenti nella fase mobile e quelli presenti nel campione.



CROMATOGRAFIA

Cromatografia a Scambio Ionico (IEC)

RESINA = POLIMERO RETICOLATO



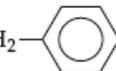
**Esempio di resina
stirene – divinilbenzene**



CROMATOGRAFIA

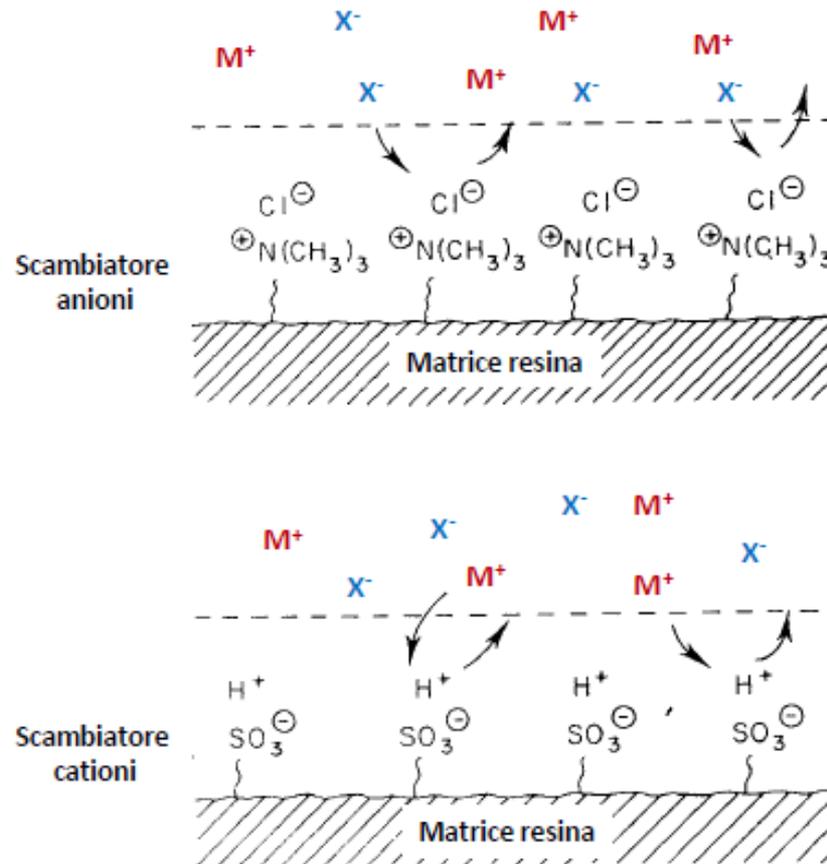
Cromatografia a Scambio Ionico (IEC)

TABELLA 22.6 Fasi stazionarie di uso comune nella cromatografia a scambio ionico

Cromatografia a scambio cationico		
Nome	Tipo di scambiatore	Struttura
Acido solfonico	Acido forte	Supporto-SO ₃ ⁻ H ⁺
Solfoetile (SE)	Acido forte	Supporto-O(CH ₂) ₂ SO ₃ ⁻ H ⁺
Solfopropile (SP)	Acido forte	Supporto-O(CH ₂) ₃ SO ₃ ⁻ H ⁺
Acido carbossilico	Acido debole	Supporto-COO ⁻ H ⁺
Carbossimetile	Acido debole	Supporto-OCH ₂ COO ⁻ H ⁺
Cromatografia a scambio anionico		
Nome	Tipo di scambiatore	Struttura
Ammonio quaternario	Base forte	Supporto-CH ₂ N(CH ₃) ₃ ⁺ Cl ⁻
Trietilaminoetile (TEAE)	Base forte	Supporto—O(CH ₂) ₂ N ⁺ $\begin{array}{l} \text{CH}_2\text{CH}_3 \\ \text{CH}_2\text{CH}_3\text{Cl}^- \\ \text{CH}_2\text{CH}_3 \end{array}$
Dietil(2-idrossipropil)aminoetil (QAE)	Base forte	Supporto—O(CH ₂) ₂ N ⁺ $\begin{array}{l} \text{CH}_2\text{CH}_3 \\ \text{CH}_2\text{CHOHCH}_3\text{Cl}^- \\ \text{CH}_2\text{CH}_3 \end{array}$
Dietilaminoetil (DEAE)	Base debole	Supporto—O(CH ₂) ₂ NH ⁺ Cl ⁻ $\begin{array}{l} \text{CH}_2\text{CH}_3 \\ \text{CH}_2\text{CH}_3 \end{array}$
p-Aminobenzil (PAB)	Base debole	Supporto—OCH ₂ —  —NH ₃ ⁺ Cl ⁻

CROMATOGRAFIA

Cromatografia a Scambio Ionico (IEC)



CROMATOGRAFIA

Cromatografia a Scambio Ionico (IEC)

La cromatografia a scambio ionico è impiegata per la separazione di amminoacidi, polipeptidi, proteine, nucleosidi, nucleotidi

Che tipo di cromatografia a scambio ionico utilizzare dipende soprattutto da:

- 1) pI delle proteine da separare
- 2) stabilità delle proteine d'interesse, in genere stabili in un ristretto *range* di pH

Per separare e purificare proteine stabili in un ampio intervallo di pH:

potrà usare **entrambi gli scambiatori** (anionico o cationico)

CROMATOGRAFIA

Cromatografia a Scambio Ionico (IEC)

Per separare e purificare proteine stabili a pH superiori al loro pI

Scambio anionico

A $\text{pH} >$ del pI (almeno una unità) la proteina è carica negativamente e lega la resina scambiatrice di anioni.

L'eluizione avviene per COMPETIZIONE con $[\text{Cl}^-]$ crescente o abbassando il pH AL DI SOTTO DEL pI .

Per separare e purificare proteine stabili a pH inferiori al loro pI

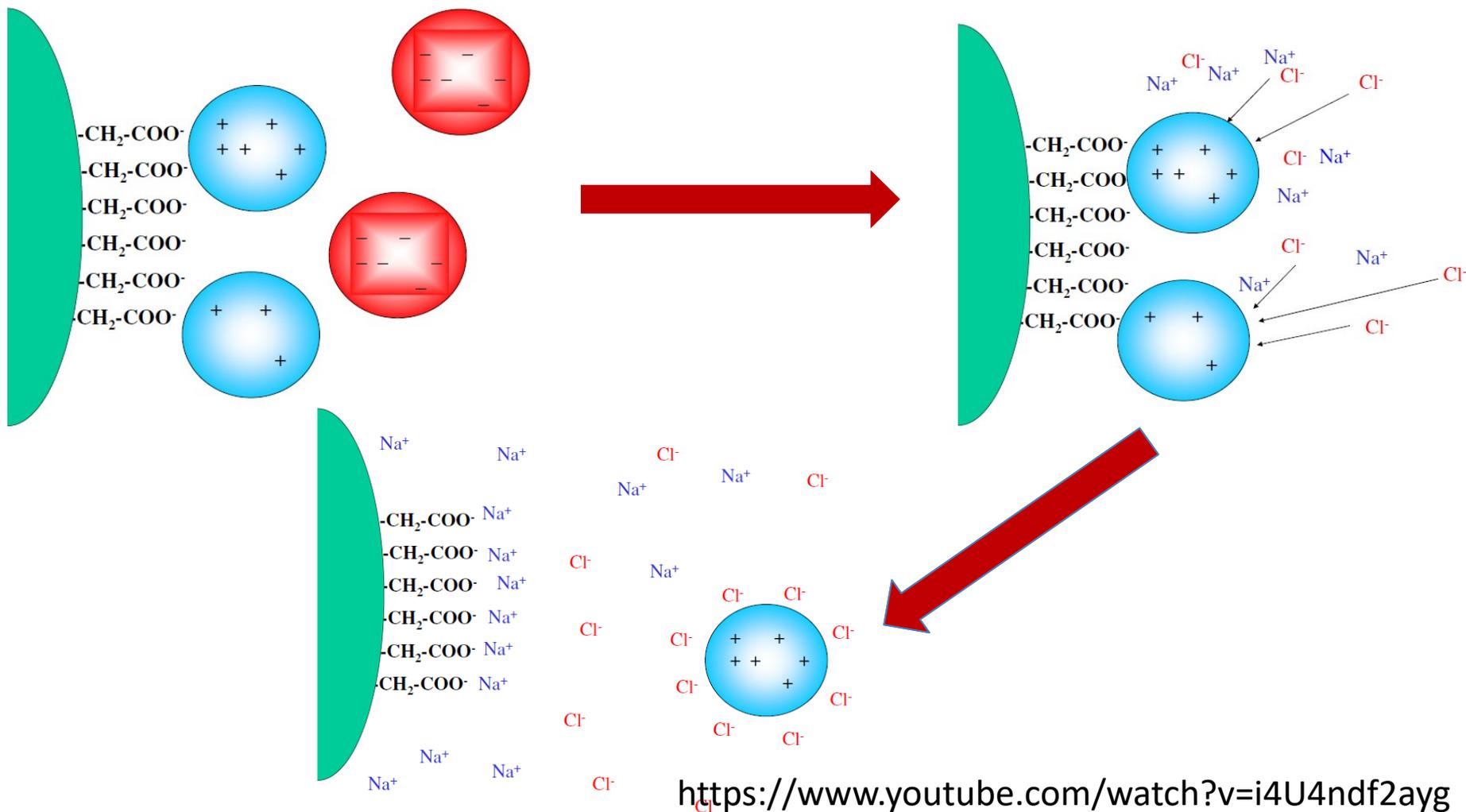
Scambio cationico

A $\text{pH} <$ del pI (almeno una unità) la proteina è carica positivamente e lega la resina scambiatrice di cationi.

L'eluizione avviene per COMPETIZIONE con $[\text{Na}^+]$ crescente o alzando il pH AL DI SOPRA DEL pI .

CROMATOGRAFIA

Cromatografia a Scambio Ionico (IEC)



CROMATOGRAFIA

Cromatografia a Scambio Ionico (IEC)

VANTAGGI

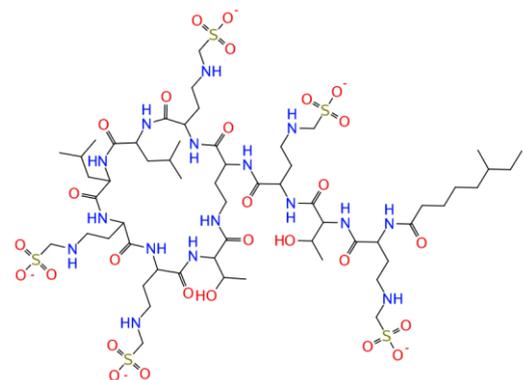
- Possibilità di caricare grandi volumi
- Eluizione della proteina di interesse in un piccolo volume

SVANTAGGI

- Esecuzione in due tempi
- Eluizione in un tampone a pH e forza ionica diversi dal tampone iniziale
- Possibilità di selezionare solo molecole ionizzabili

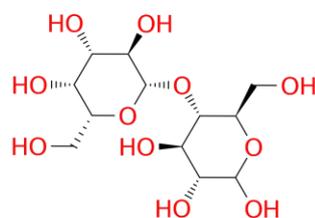
CROMATOGRAFIA

Come separereste questi molecole?



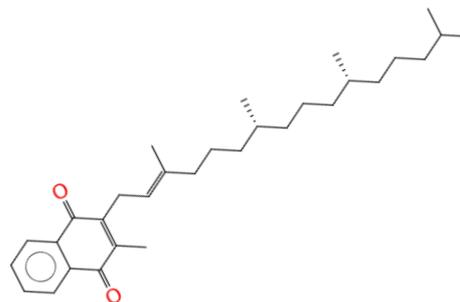
Colistina

CaricaF=-5
diametro=35 Å
 $\log P_{o/w} = -3.3$



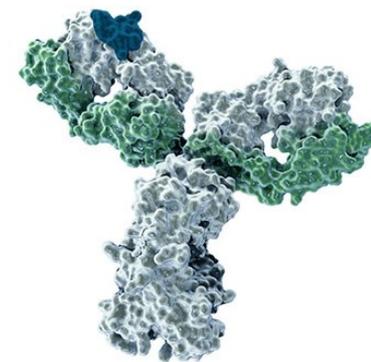
lattosio

CaricaF=0
diametro=10 Å
 $\log P_{o/w} = -4.7$



Vitamina K

CaricaF=0
diametro=21 Å
 $\log P_{o/w} = 9.69$

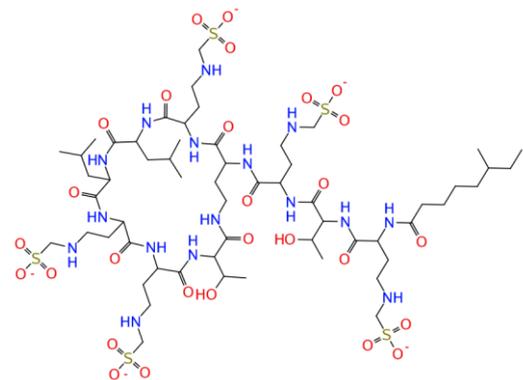


Rituximab

CaricaF=
Diametro>300Å
 $\log P_{o/w} =$

CROMATOGRAFIA

Come separereste questi molecole?



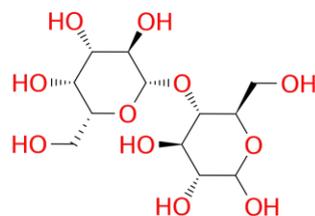
Colistina

CaricaF=-5

diametro=35 Å

logP_{o/w}=-3.3

Cromatografia di
Scambio anionico



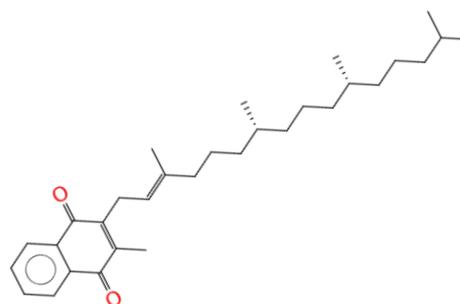
lattosio

CaricaF=0

diametro=10 Å

logP_{o/w}= -4.7

Cromatografia di
Ripartizione
(fase normale)



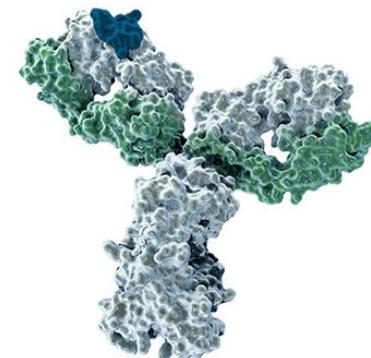
Vitamina K

CaricaF=0

diametro=21 Å

logP_{o/w}= 9.69

Cromatografia di
Ripartizione
(fase inversa)



Rituximab

CaricaF=

Diametro>300Å

logP_{o/w}=

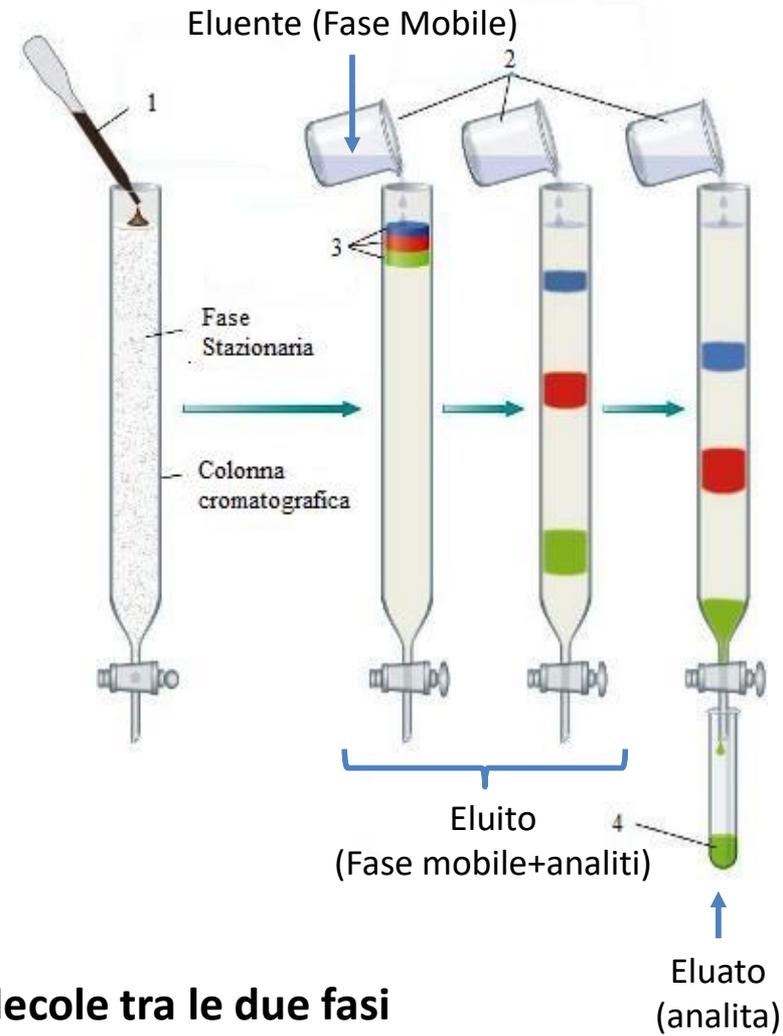
Cromatografia di
Esclusione

CROMATOGRAFIA

Il Processo Cromatografico: parametri nella corsa cromatografica

Procedimento cromatografico

- il campione è introdotto nella FM
- la FM eluisce in continuo attraverso la FS
- i componenti più affini alla FS ne vengono trattenuti
- i componenti più affini alla FM si sposteranno più velocemente
- la separazione dei componenti avviene in quanto **ogni sostanza ha una distribuzione caratteristica tra le due fasi**



Ripartizione differenziale delle molecole tra le due fasi

CROMATOGRAFIA

Il Processo Cromatografico: parametri nella corsa cromatografica

Ripartizione differenziale delle molecole tra le due fasi

Coefficiente di Distribuzione (K)

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

FISSO nel TEMPO

VARIABILE nel TEMPO

Sistema cromatografico fisso nel tempo
FASE MOBILE e FASE STAZIONARIA
non cambiano

Sistema cromatografico variabile nel
tempo FASE MOBILE e FASE STAZIONARIA
cambiano

CROMATOGRAFIA ISOCRATICA

utilizzo di un solo solvente

CROMATOGRAFIA IN GRADIENTE

variazioni continue di pH, concentrazione, polarità

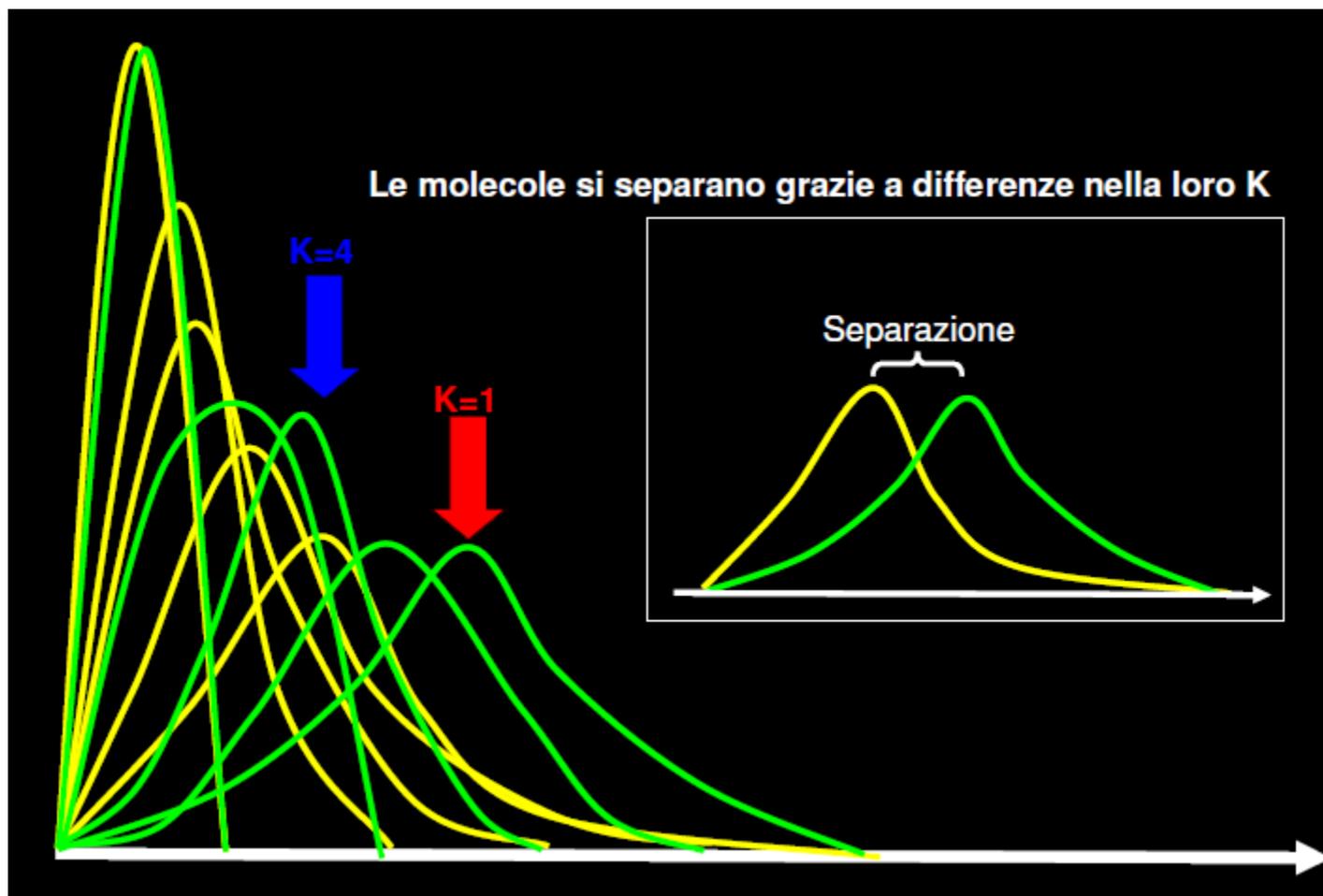
L'entità delle interazioni che si stabiliscono tra le fase mobile e stazionaria e le molecole

Rimangono **invariate** nel tempo

Si **modificano** nel tempo

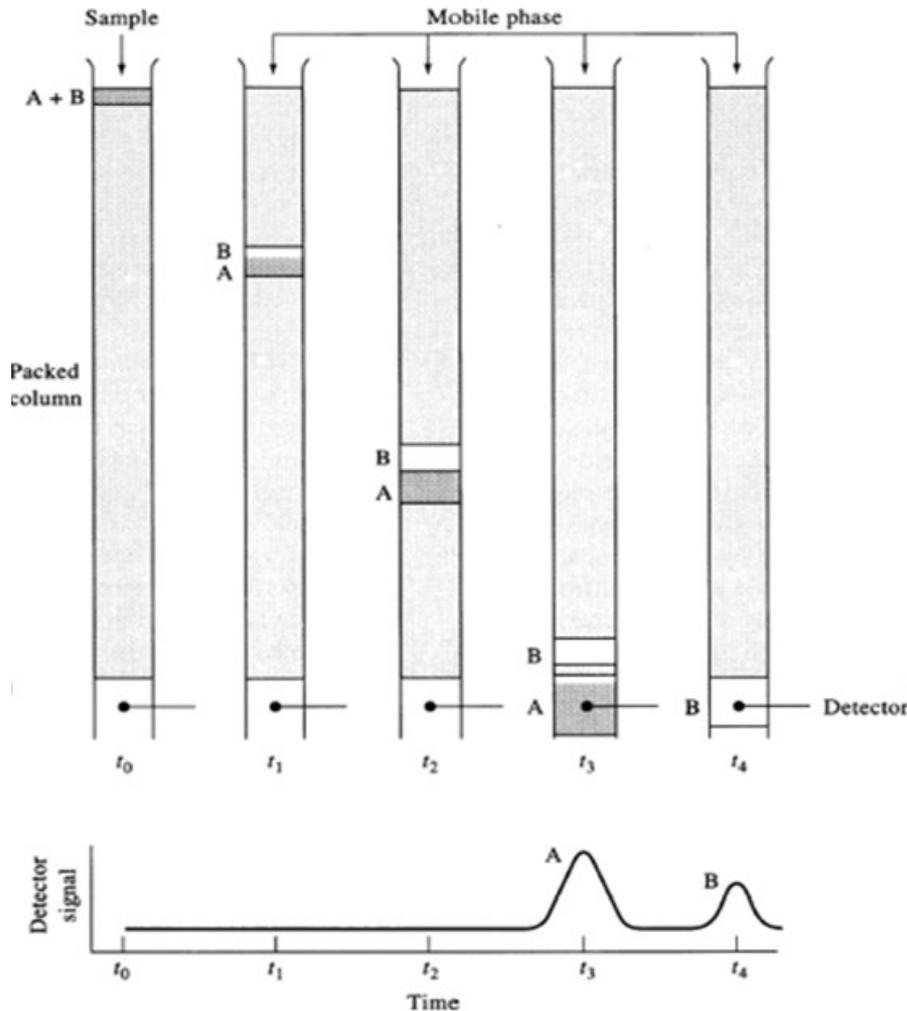
CROMATOGRAFIA

Il Processo Cromatografico: parametri nella corsa cromatografica



CROMATOGRAFIA

Il Processo Cromatografico: parametri nella corsa cromatografica



Ogni soluto migrerà con una velocità proporzionale alla sua K . Ponendo all'uscita della colonna un **rivelatore** che misuri la **concentrazione del soluto nell'eluato** e riportando il segnale in funzione del tempo si può ottenere un **cromatogramma**.

La posizione dei picchi sull'asse dei tempi: **t di ritenzione** (per identificare i componenti)

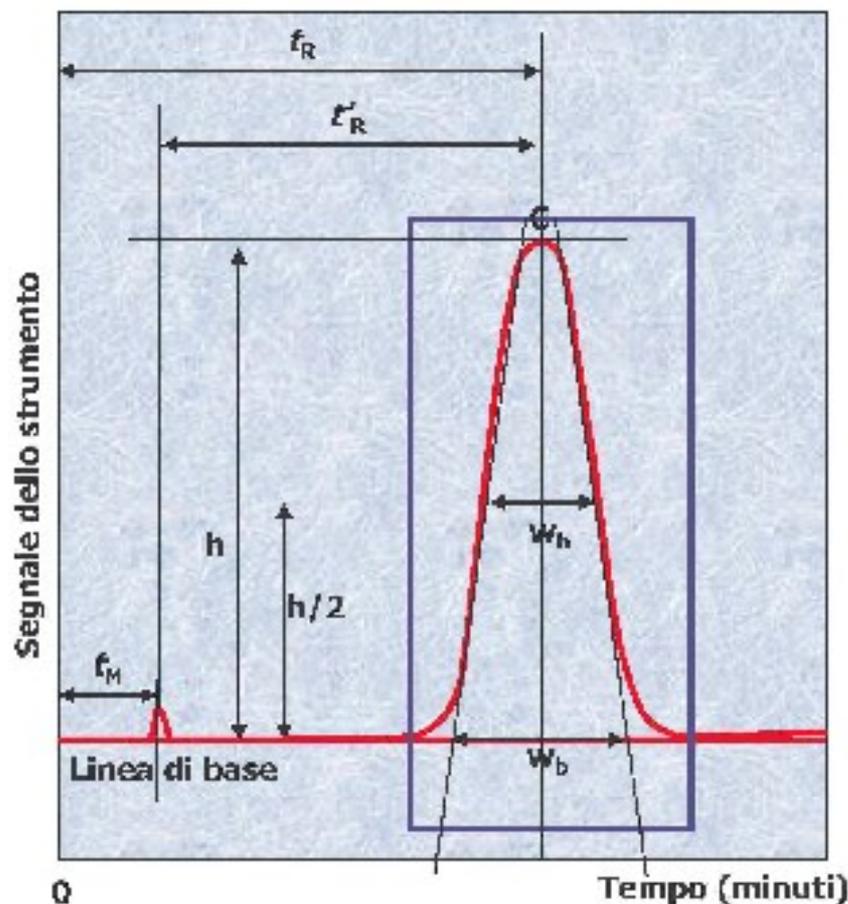
L'area sottesa dai picchi è proporzionale alla quantità del singolo componente e può essere utilizzata a scopo quantitativo

CROMATOGRAFIA

Parametri che caratterizzano un singolo picco cromatografico:

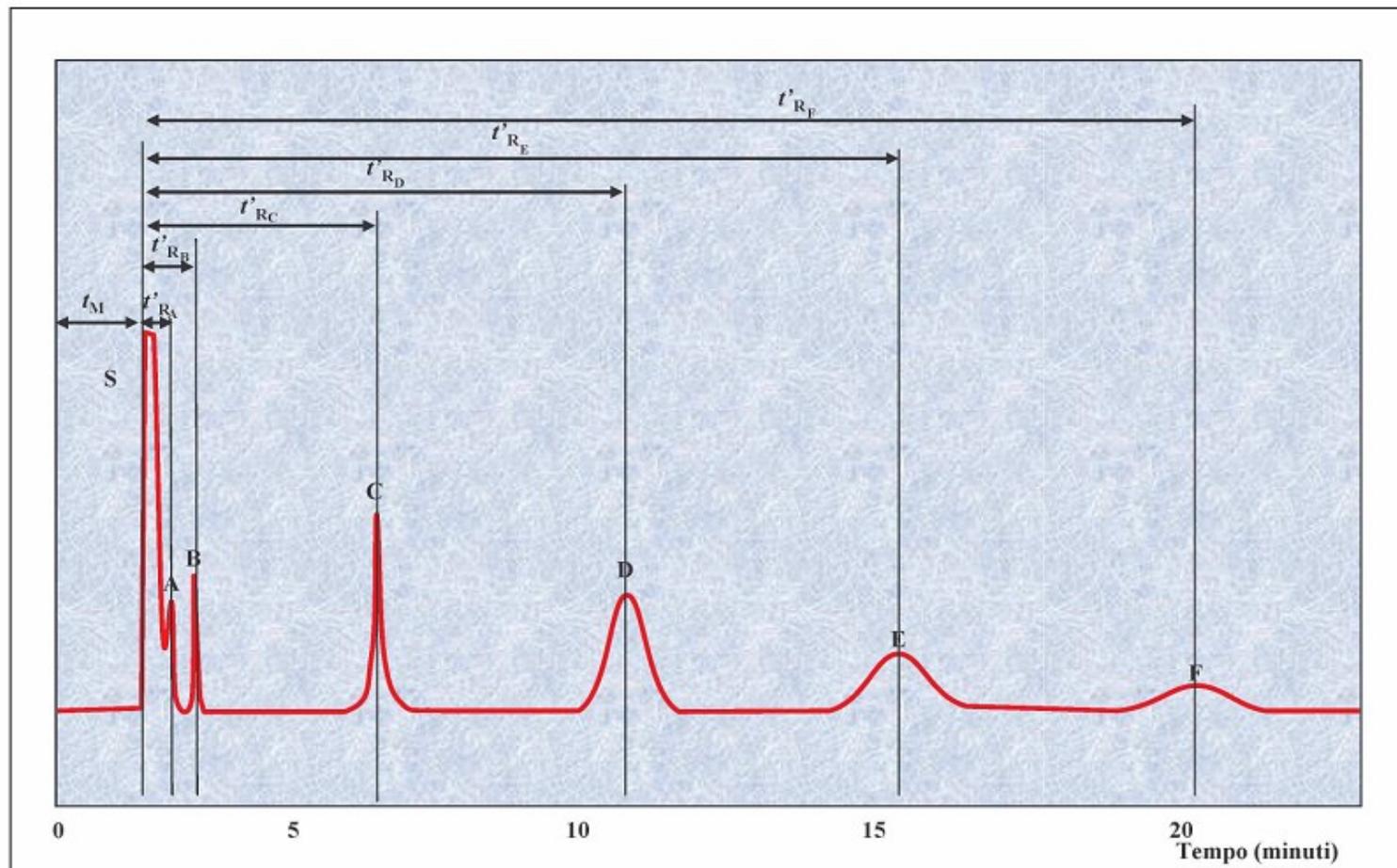
C = punto di massimo

- **Tempo di ritenzione (t_R)** = tempo impiegato da ciascuna sostanza per scorrere attraverso la colonna, misurato a partire dall'istante in cui la miscela viene introdotta nello strumento, fino all'istante in cui si registra il massimo del tracciato cromatografico
- **Altezza del picco (h)** = distanza tra il punto massimo e la linea di base
- **Larghezza alla base del picco (w_b)** = lunghezza del segmento interpolato all'intersezione fra le tangenti ai flessi della gaussiana e la linea di base
- **Larghezza a metà altezza (w_h)** = larghezza del picco misurata a metà altezza
- **Tempo morto (t_M)** = tempo di ritenzione di una sostanza non trattenuta dalla fase stazionaria
- **Tempo di ritenzione corretto (t'_R)** = tempo effettivamente speso da ogni sostanza eluita nelle interazioni chimico-fisiche con la fase stazionaria ($t_R - t_M$).



CROMATOGRAFIA

Il Processo Cromatografico: parametri nella corsa cromatografica

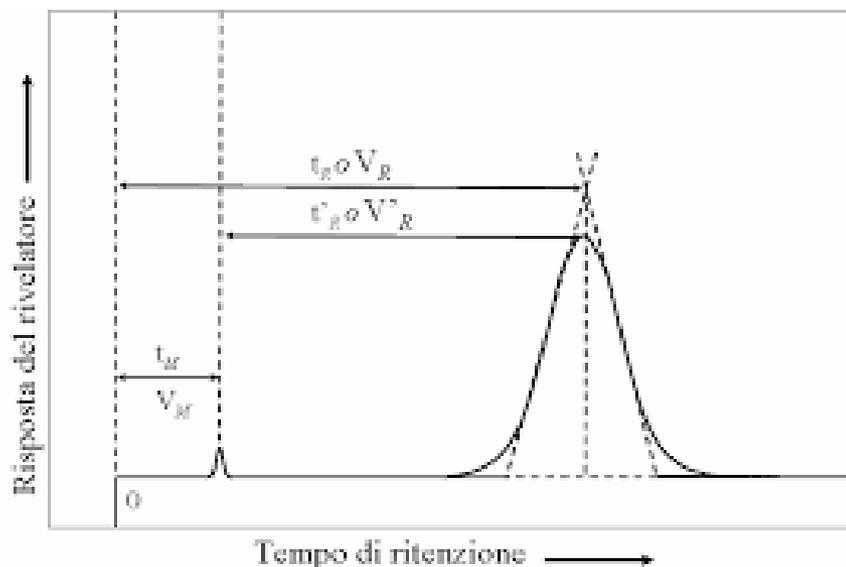


Il fattore di ritenzione, diverso per ciascuna sostanza (da A a F), costituisce il parametro qualitativo dell'analisi cromatografica, mentre l'area sottesa alla curva costituisce il parametro quantitativo.

CROMATOGRAFIA

Parametri che caratterizzano un singolo picco cromatografico:

Oltre a t_R , è possibile quantificare l'interazione di un soluto con la FS mediante il **volume di ritenzione (V_R)**, ossia il volume di fase mobile necessario per eluire un picco dall'iniezione all'uscita della colonna di fase mobile $V_R = t_R \times F$; dove F = portata di flusso (mL/sec)



La **velocità 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.

CROMATOGRAFIA

Il Processo Cromatografico: parametri nella corsa cromatografica

Fattore di capacità o fattore di ritenzione (k')

è un parametro sperimentale usato per descrivere le **velocità di migrazione** del soluto: misura del tempo che un determinato composto impiega ad attraversare la colonna in rapporto al tempo impiegato da un composto non trattenuto

$$k' = \frac{t_R - t_M}{t_M} = \frac{t'_R}{t_M}$$

tempo di ritenzione corretto

tempo morto

Nel caso di un composto non trattenuto, k' è uguale a 0.

Il fattore di ritenzione è una misura della ritenzione da parte della fase stazionaria.

CROMATOGRAFIA

Fattore di capacità o fattore di ritenzione (k')

E' anche vero che k' dipende anche dalla quantità del soluto nelle due fasi. Poiché la quantità e la concentrazione sono in relazione con il volume, si può scrivere:

$$k' = \frac{\text{Quantità di soluto nella FS}}{\text{Quantità di soluto nella FM}} = \frac{C_s \times V_s}{C_M \times V_M}$$

Possiamo quindi sostituire K (coefficiente di distribuzione) nel eq. del fattore di ritenzione

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

Coefficiente di distribuzione



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

Relazione tra tempo di ritenzione (fattore di ritenzione) e coefficiente di distribuzione

CROMATOGRAFIA

Il Processo Cromatografico: parametri nella corsa cromatografica

Fattore di capacità o fattore di ritenzione (k')

Cosa possiamo ricavare dalla relazione tra tempo di ritenzione e coefficiente di distribuzione?

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

Dipende dalla
natura del
soluto

- dalla T°
- dalla natura delle fasi
- dalle caratteristiche della colonna (impaccamento, granulometria e spessore della FS)

E cosa succede se abbiamo due sostanze?

CROMATOGRAFIA

Il Processo Cromatografico: parametri nella corsa cromatografica

fattore di separazione o selettività (α)

Se abbiamo due composti A e B caratterizzati da coefficienti di distribuzione K_A e K_B e di conseguenza fattori di capacità k'_A k'_B possiamo definire il **fattore di separazione**:

$$\alpha = \frac{k'_B}{k'_A} = \frac{K_B}{K_A} = \frac{(t'_R)_B}{(t'_R)_A}$$

AFFINCHE' ci sia separazione $K_A \neq K_B$!!!

....e quindi $\alpha \neq 1$!!!!

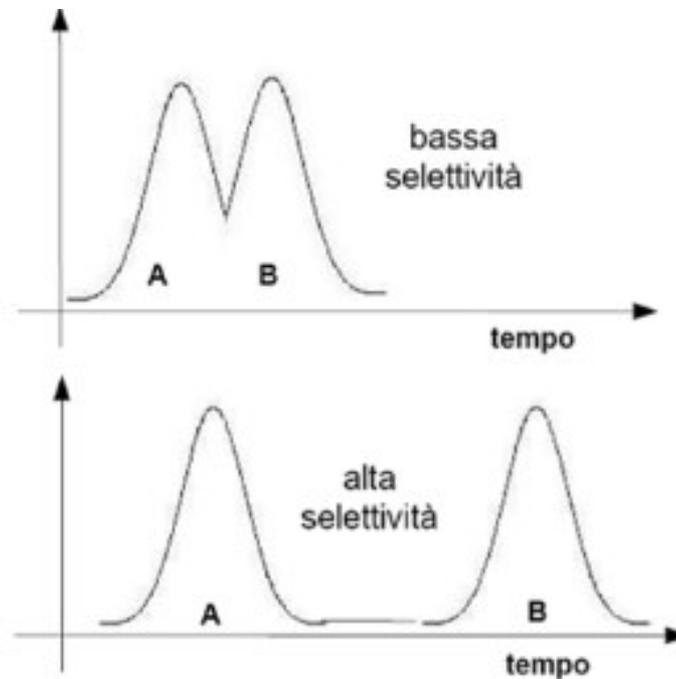
La ritenzione relativa di due soluti è proporzionale al rapporto dei loro coefficienti di ripartizione. Questa relazione è il **fondamento fisico della cromatografia**.

CROMATOGRAFIA

Il Processo Cromatografico: parametri nella corsa cromatografica

fattore di separazione o selettività (α)

La selettività è una misura del tempo o della distanza tra due picchi.

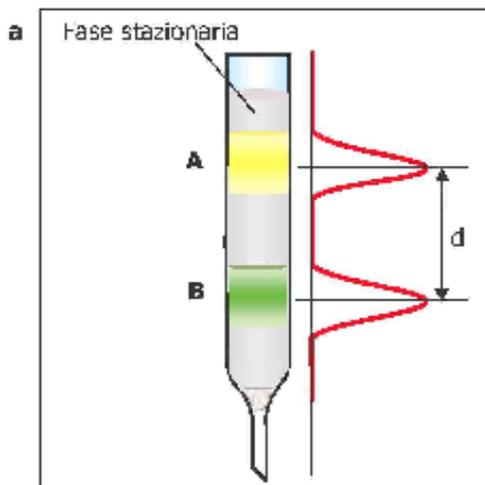


CROMATOGRAFIA

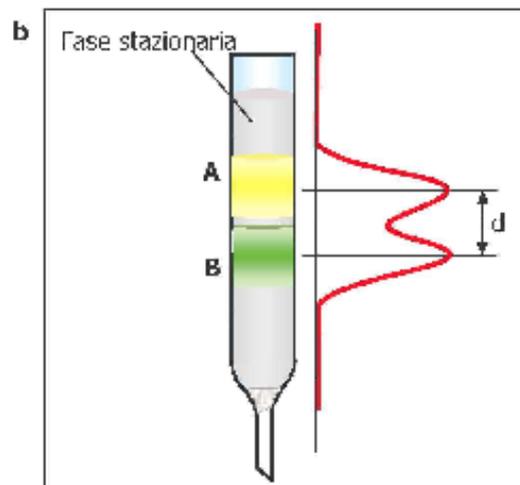
Il Processo Cromatografico: parametri nella corsa cromatografica

La **differenza nei tempi di eluizione tra i picchi** indica la **selettività**. Quantifica la **capacità** di un sistema cromatografico di **eluire specie chimiche diverse in diversi tempi**.

Effetto della selettività sulla separazione dei picchi cromatografici



Buona selettività



Selettività insufficiente

CROMATOGRAFIA

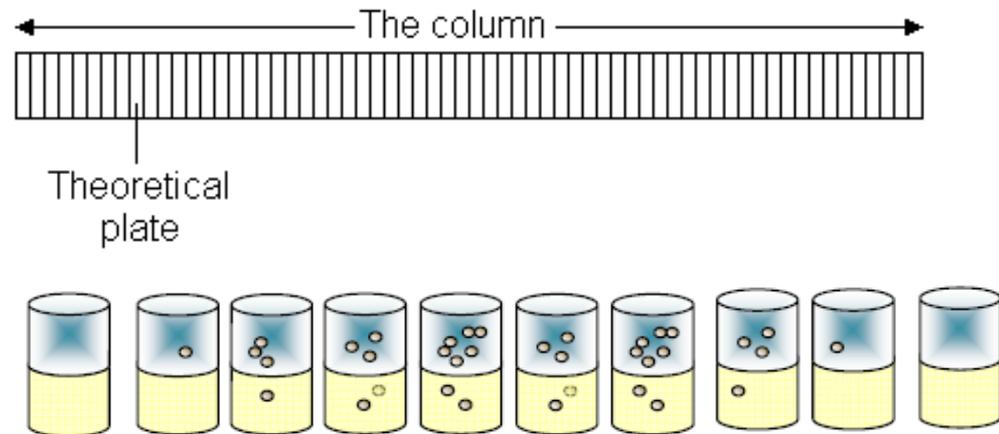
Il Processo Cromatografico: parametri nella corsa cromatografica

Parametri che descrivono quantitativamente l'**efficienza** di una colonna

- 1) Altezza equivalente di piatto teorico H
- 2) Numero di piatti teorici N

Piatto teorico: zona della colonna dove si ha l'equilibrio di distribuzione dell'analita tra FS e FM. Termine preso in prestito dalla teoria della distillazione, nella quale la separazione si può eseguire in stadi discreti detti piatti.

Poiché in cromatografia si ha una sequenza continua di stati di equilibrio e non vi è possibilità di realizzare una singola separazione, N ha un significato puramente matematico.



CROMATOGRAFIA

Numero dei Piatti Teorici (N) e Altezza del Piatto Teorico (H)

Conoscendo il numero di piatti teorici (N) di una colonna e la sua lunghezza si può calcolare la l'altezza equivalente di un piatto teorico (H).

$$N = \frac{L}{H}$$

L = lunghezza colonna

Esempio pratico:

- Colonna da esclusione molecolare: Sephadex 75 HiLoad
- Larghezza: 16 mm
- Lunghezza: 600 mm
- N = 7800



$$H = 0.6 / 7800 = 0,0000769 = 76 \mu\text{m}$$



CROMATOGRAFIA

Numero dei Piatti Teorici (N) e Altezza del Piatto Teorico (H)

Altezza del piatto piccola

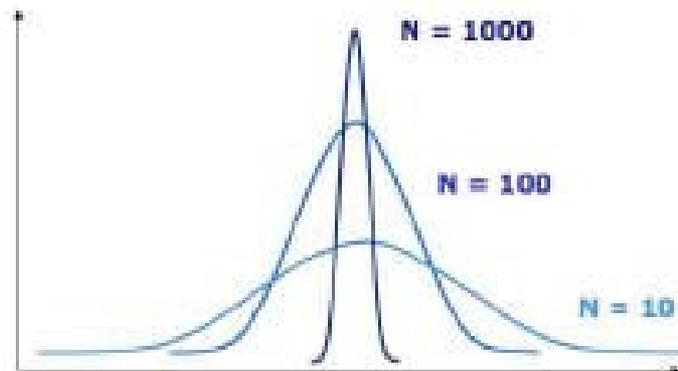


Picchi stretti



Migliori separazioni

Più elevato è il numero di piatti teorici, più grande è la probabilità di una separazione, migliore è l'EFFICIENZA della colonna.

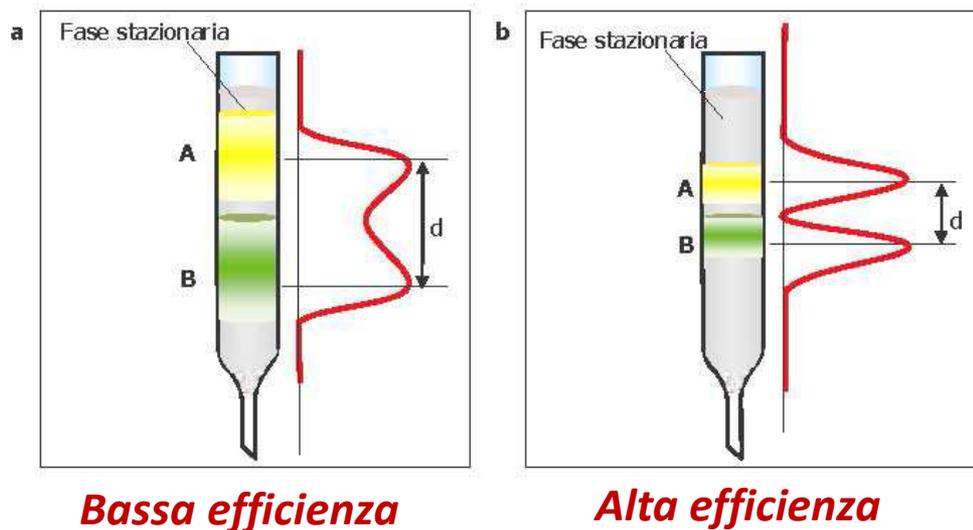


CROMATOGRAFIA

Il Processo Cromatografico: parametri nella corsa cromatografica

La **larghezza dei picchi** indica l'efficienza: più larghi sono i picchi e peggiore è la loro separazione.

Effetto della efficienza sulla separazione dei picchi cromatografici

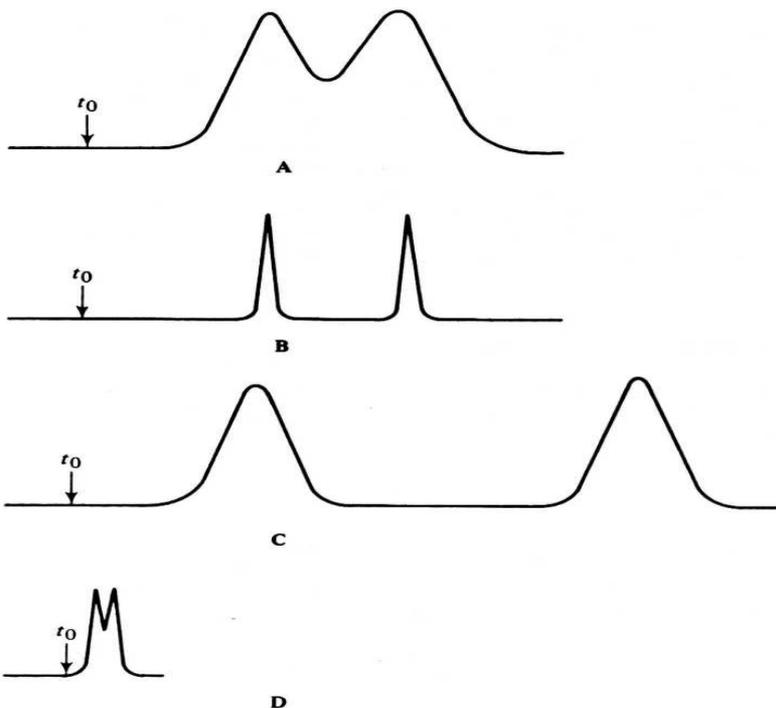


CROMATOGRAFIA

Il Processo Cromatografico: parametri nella corsa cromatografica

RISOLUZIONE

Una **buona risoluzione** può derivare sia da una **buona efficienza** (picchi molto stretti, elevato numero di piatti teorici) sia da una **buona selettività**.



risoluzione scarsa per scarsa efficienza e scarsa selettività

buona risoluzione dovuta a buona efficienza e buona selettività

buona risoluzione dovuta a buona selettività, ma efficienza non troppo elevata

risoluzione scarsa dovuta ad una bassa selettività

CROMATOGRAFIA

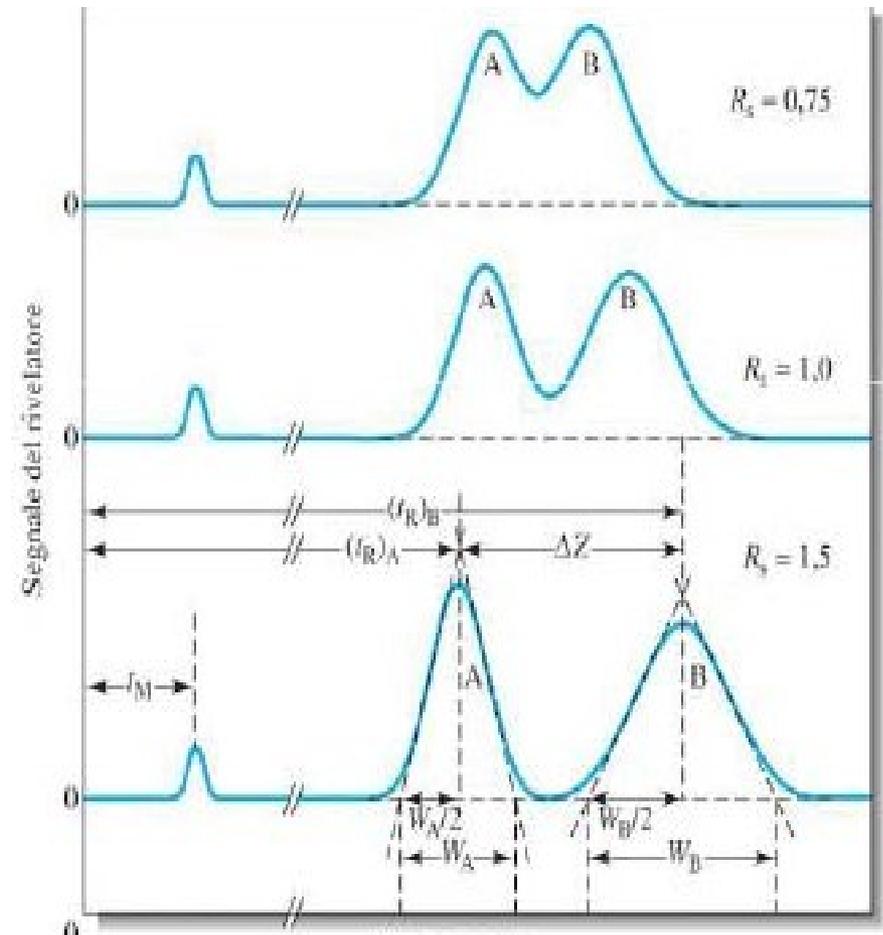
RISOLUZIONE

$$R = \frac{2 \times \Delta Z}{(W_A + W_B)}$$

ΔZ = Distanza tra i picchi

W_A = Larghezza alla Base del Picco A

W_B = Larghezza alla Base del Picco B



Sarebbe preferibile una risoluzione uguale o superiore a 1.5

CROMATOGRAFIA

Il Processo Cromatografico: parametri nella corsa cromatografica

$$R_s = \underbrace{\frac{1}{4} \sqrt{N}}_{\text{Efficienza}} \cdot \underbrace{\left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right)}_{\text{Selettività}} \cdot \underbrace{\left(\frac{k}{1 + k} \right)}_{\text{Ritenzione}}$$

Efficienza

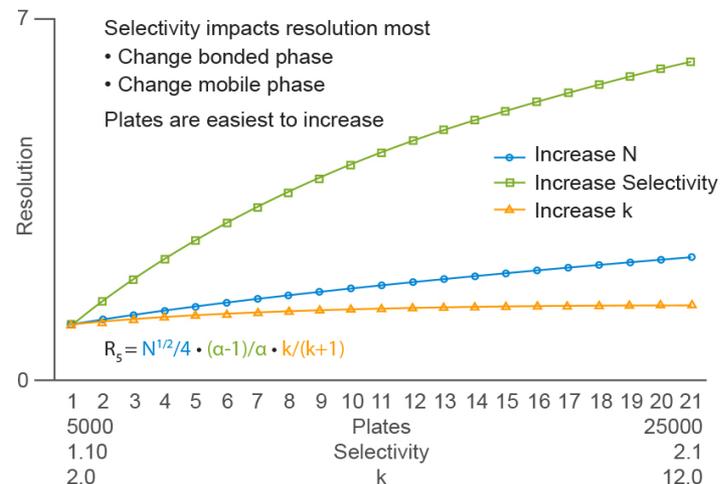
Selettività

Ritenzione

RISOLUZIONE

È possibile migliorare la risoluzione migliorando uno qualsiasi di questi parametri:

- **La selettività** è il fattore che più influisce sulla risoluzione. Piccole variazioni di selettività si traducono in variazioni cospicue di risoluzione.
- **La ritenzione** è un fattore significativo a valori ridotti di k.
- **L'efficienza** rappresenta la capacità di separazione della colonna.



CROMATOGRAFIA

Per ottenere un'alta risoluzione con una determinata colonna, è necessario massimizzare 3 termini.

Aumentare il numero di piatti teorici:

- aumentando la lunghezza della colonna (attenzione può provocare anche un aumento della larghezza della banda)

Ridurre l'altezza del piatto teorico:

- riducendo la dimensione delle particelle della fase stazionaria.

Fattore di capacità:

- variando la composizione FS.

CROMATOGRAFIA

Il modello dei piatti teorici è utile didatticamente per comprendere le basi del processo di separazione ma soprattutto permette di avere un modello matematico che identifica le variabili per ottimizzarlo.

Tuttavia la teoria dei piatti trascura l'aspetto cinetico; banalmente la velocità del flusso della fase mobile influisce sulla larghezza del picco. Per spiegare questa relazione si usa un'ulteriore teoria, detta cinetica.

Ci sono **tre meccanismi responsabili della dispersione del soluto nella colonna (allargamento picco)**:

- Diffusione Vorticososa
- Diffusione Longitudinale
- Trasferimento di Massa

CROMATOGRAFIA

Equazione di van Deemter

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

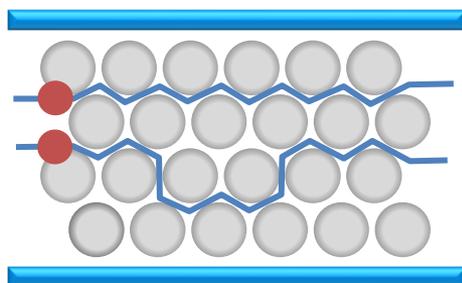
- Diffusione vorticososa
- Coefficiente di diffusione
- Resistenza al trasferimento di massa

Esprime l'influenza della colonna e della velocità del flusso sull'altezza del piatto

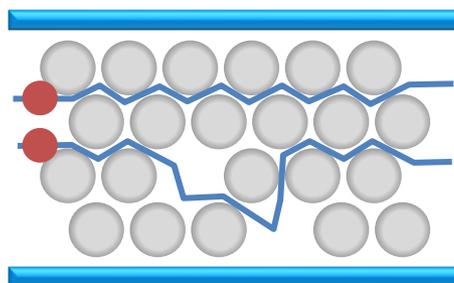
CROMATOGRAFIA

Diffusione vorticososa

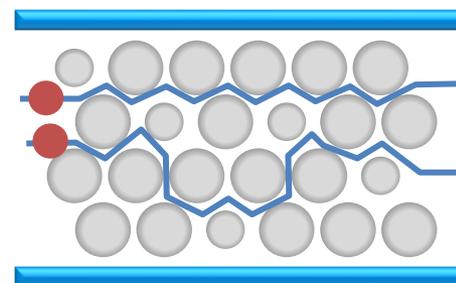
Presenza di differenze nei percorsi dovute a:



Percorsi diversi



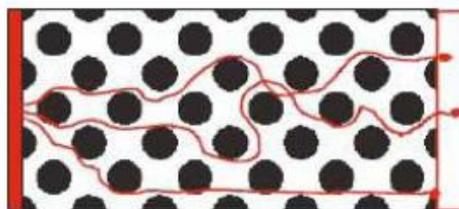
Scarsa qualità
dell'impaccamento
della colonna



Ampia distribuzione delle
dimensioni delle particelle

Larghezza di banda iniziale

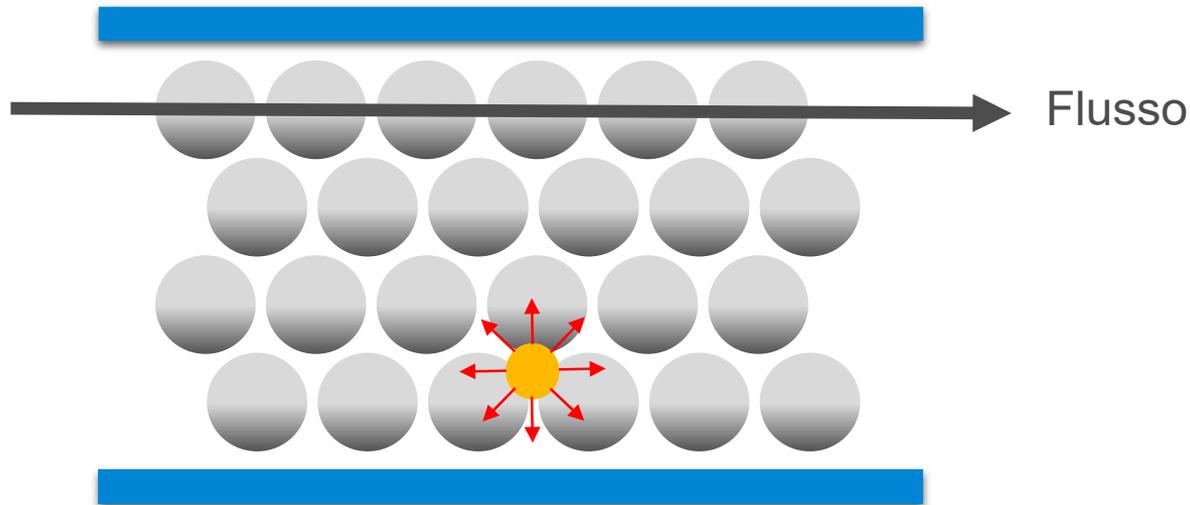
Larghezza di banda finale



CROMATOGRAFIA

Diffusione assiale o longitudinale

- Aumento nell'ampiezza del picco a causa di fenomeni di auto-diffusione dell'analita
- A bassi valori di flusso l'analita rimane nella fase mobile per un periodo prolungato
 - Netto aumento nell'ampiezza del picco
 - Incremento dell'altezza di un piatto teorico



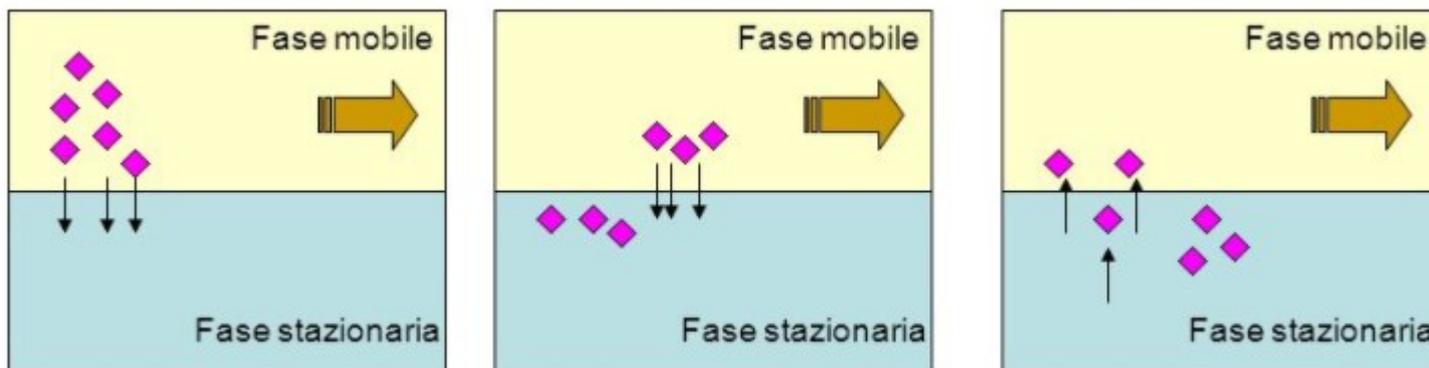
CROMATOGRAFIA

Resistenza al trasferimento di massa

Esiste un tempo necessario perché il soluto raggiunga l'equilibrio tra FM e FS.

All'inizio le molecole di analita più vicine alla FS diffondono dalla FM alla FS. Le molecole rimaste nella fase mobile si spostano trascinate dalla corrente dell'eluente e diffondono nella FS in un momento successivo creando un allargamento della banda. Lo stesso meccanismo di diffusione asimmetrica si instaura per il procedimento inverso (da FS a FM).

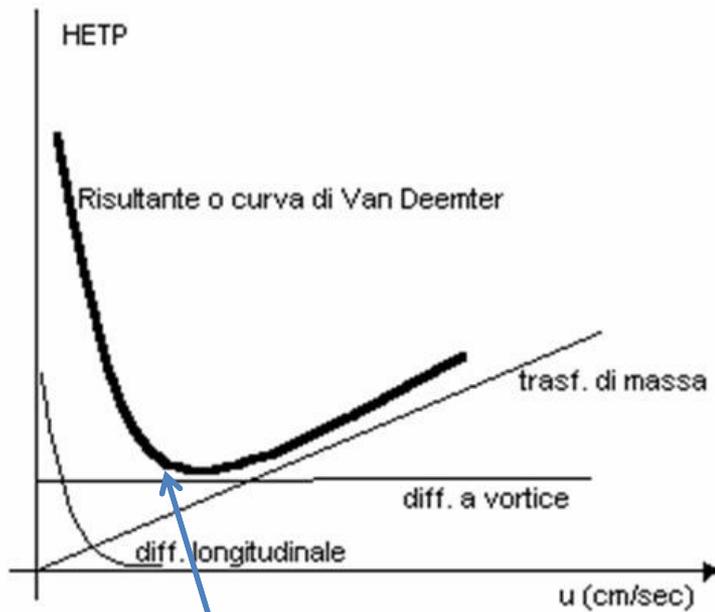
Questo processo **dipende dalla diffusività del soluto dalla FS alla FM e viceversa, diminuisce con il diminuire della viscosità del solvente ed aumenta con l'aumentare della velocità della FM.**



CROMATOGRAFIA

L'efficienza dipende da variabili cinetiche:

- Velocità della FM
- Dimensioni delle particelle della FS e suo impaccamento
- Diametro della colonna



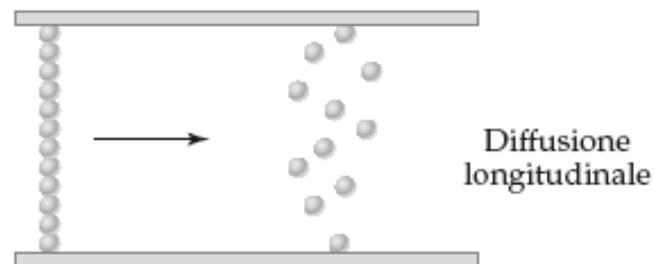
Equazione di Van Deemter

Effetto della v di flusso della FM sull'altezza di un piatto

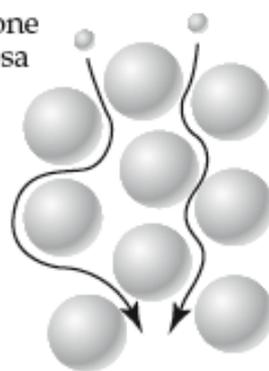
**FLUSSO
OTTIMALE!**

CROMATOGRAFIA

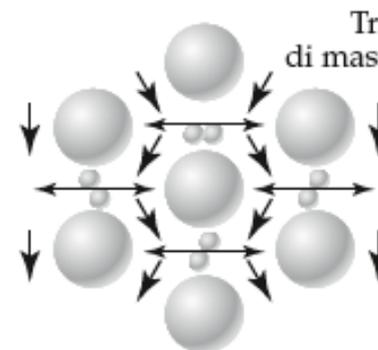
<https://www.youtube.com/watch?v=fRJ4dJ6-66U>



Diffusione vorticososa



Trasferimento di massa in fase mobile



Trasferimento di massa in fase mobile stagnante



Trasferimento di massa in fase stazionaria



FIGURA 20.14 Processi di allargamento delle bande che possono verificarsi in cromatografia.

CROMATOGRAFIA

Ottimizzazione delle prestazioni di una colonna, resoconto finale:

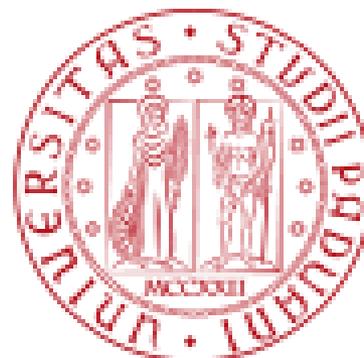
FASE MOBILE

1. *Natura del solvente*
2. *Flusso*

FASE STAZIONARIA

1. *Fattore di capacità K'* (composizione FS, Temperatura della colonna)
2. *Fattore di selettività α* (composizione FS, Temperatura della colonna)
3. *Numero dei piatti teorici* (lunghezza della colonna, H)
4. *Altezza del piatto teorico*
(dimensioni delle particelle FS, flusso FM, viscosità FM, impaccamento colonna)

1222 · 2022
800
ANNI



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA