

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

TECNICHE CROMATOGRAFICHE

CROMATOGRAFIA

ELEMENTI MINIMI

Colonna

- Serbatoio per la FM
- Dispositivo che consente l'identificazione degli analiti a mano a mano che essi lasciano la colonna nell'eluato
- Raccoglitore di frazioni

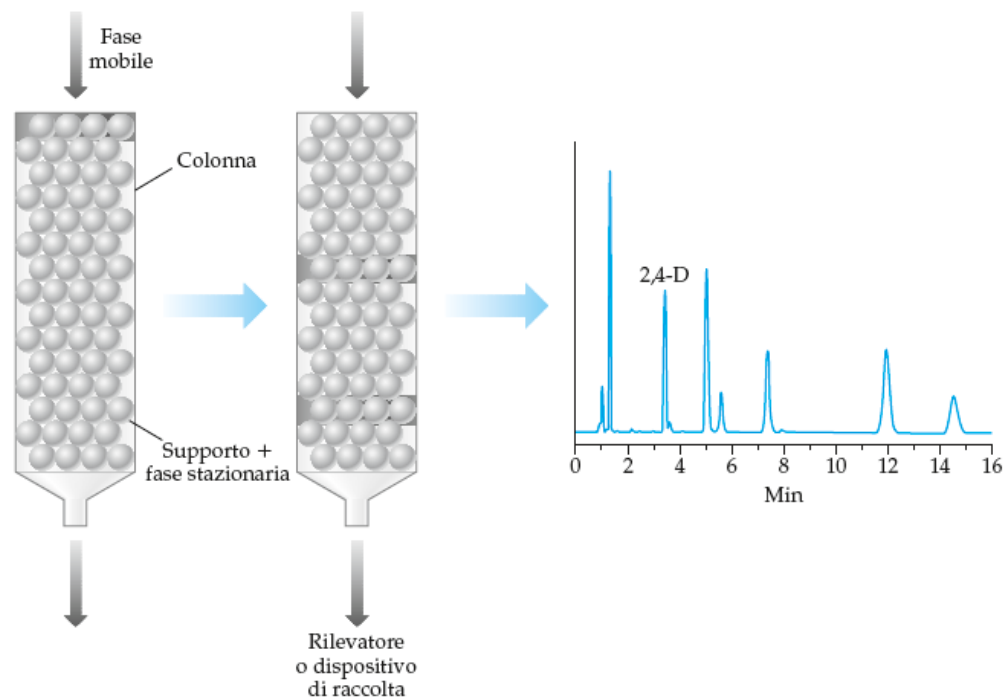


FIGURA 20.9 Separazione del 2,4-D da altri componenti del campione mediante cromatografia. Sulla sinistra di questa figura sono rappresentati i principali componenti di un sistema cromatografico (fase mobile, fase stazionaria e supporto, che insieme formano la "colonna"). Il grafico a destra (detto "cromatogramma") indica la quantità misurata di ciascuna sostanza che fuoriesce dalla colonna dopo un certo intervallo di tempo (o volume di fase mobile utilizzata). (Il cromatogramma è stato riprodotto su gentile concessione della Sigma-Aldrich.)

CROMATOGRAFIA

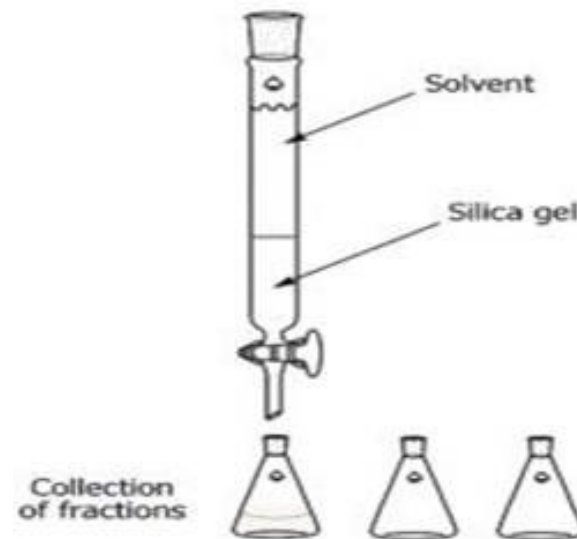
CROMATOGRAFIA su COLONNA CLASSICA

Colonne: vetro (1-5 cm di diametro, lunghezza media 25-50 cm ma si può arrivare fino a 5 m!)

FS: materiale solido adsorbente (LSC) o supporto granulare inerte impregnato con solvente opportuno (per LLC) o resina a scambio ionico, etc. Diametro particelle: 150 - 200 μm

FM: viene fatto fluire attraverso la colonna grazie alla forza di gravità o la spinta di gas (aria o azoto) compresso.

Standard column chromatography



NON PERMETTE DI UTILIZZARE FASI STAZIONARIE A GRANULOMETRIA TROPPO FINE IN QUANTO L'ECCESSIVO IMPACCAMENTO OSTACOLA IL FLUIRE DEL SOLVENTE. Es. Gel di silice dimensione minima per cromatografia (75 μm)

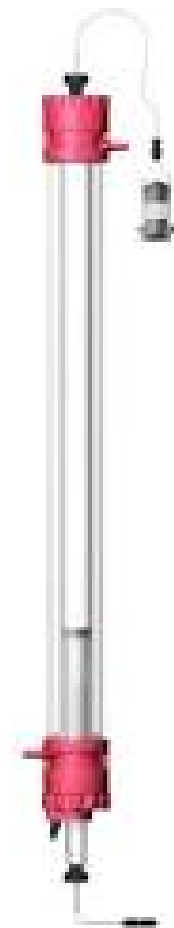
CROMATOGRAFIA

CROMATOGRAFIA su COLONNA MEDIA PRESSIONE

Colonne: materiale plastico (1-5 cm di diametro, lunghezza massima un metro).

FS: Resina inerte funzionalizzata (affinità o scambiatrice ionica) o resine reticolate per l'esclusione molecolare. Sono capaci di processare quantitativi notevoli di sostanza.

FM: fluisce a media pressione (1-10 atm, con flussi nell'ordine del mL/min) spinta da pompe resistenti alla pressione.



CROMATOGRAFIA

CROMATOGRAFIA LIQUIDA AD ALTA PRESTAZIONE (HPLC)

Evoluzione strumentale ad alta efficienza

E' la tecnica cromatografica più diffusa, efficace e versatile

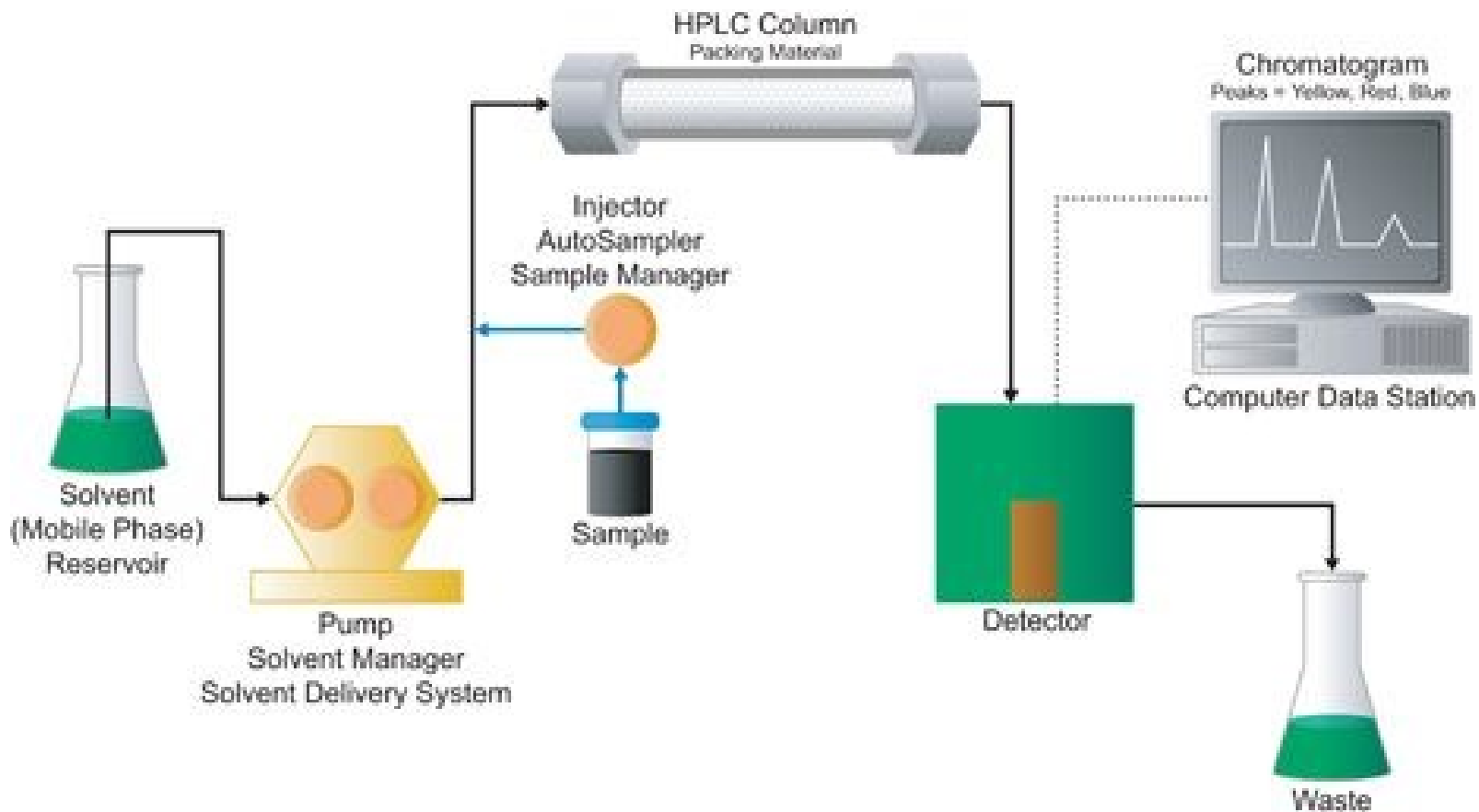
Colonne: 0.5-1 cm di diametro, lunghezza 20-25 cm, resistenti ad alte pressioni (colonne in metallo)

FS: granulometria fine (3-10 μm)

FM: fluisce ad alta P (50-400 atm, con flussi nell'ordine del mL/min) spinta da pompe resistenti alle alte pressioni



CROMATOGRAFIA

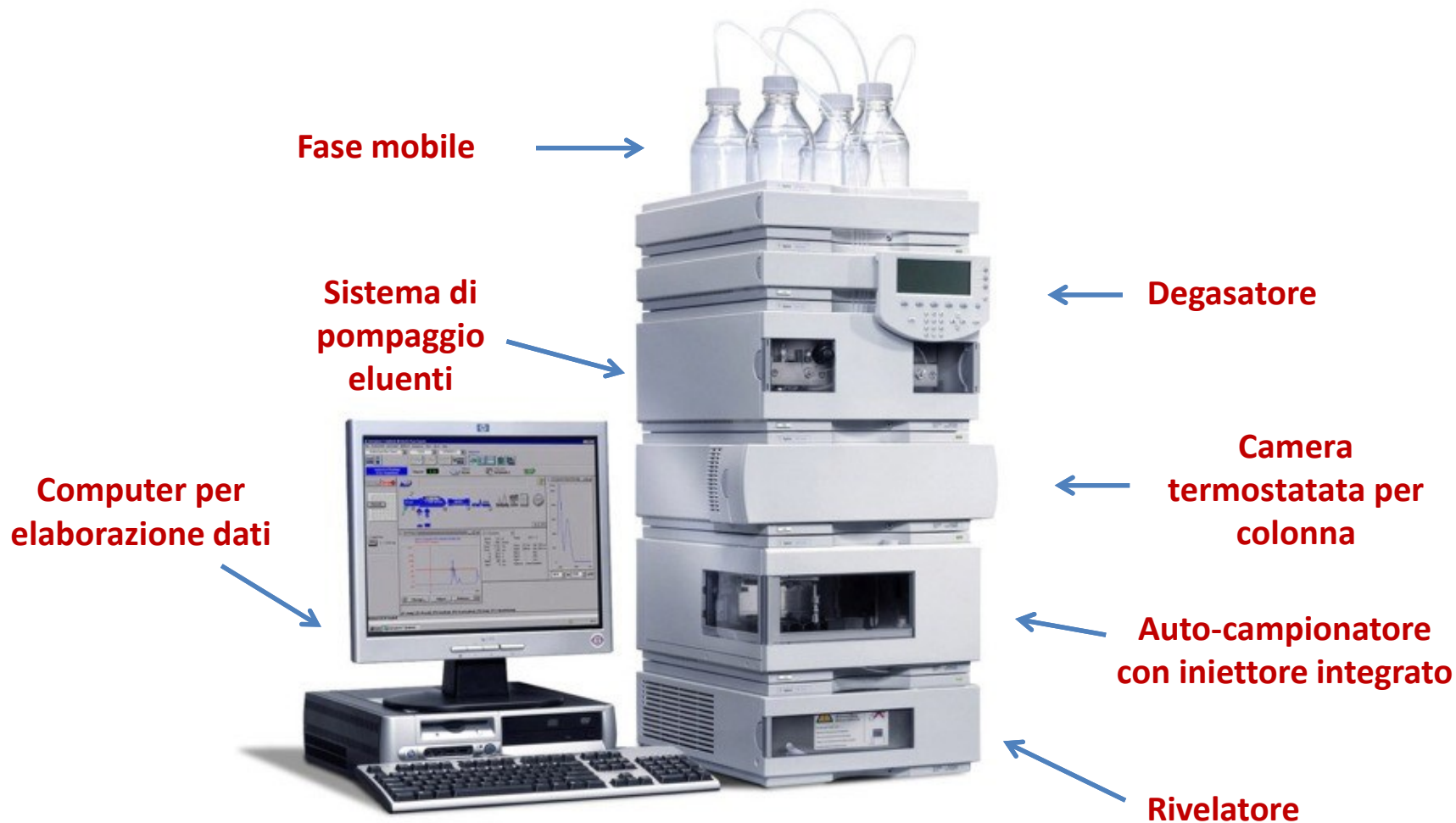


CROMATOGRAFIA

Composizione di un sistema HPLC di ultima generazione:

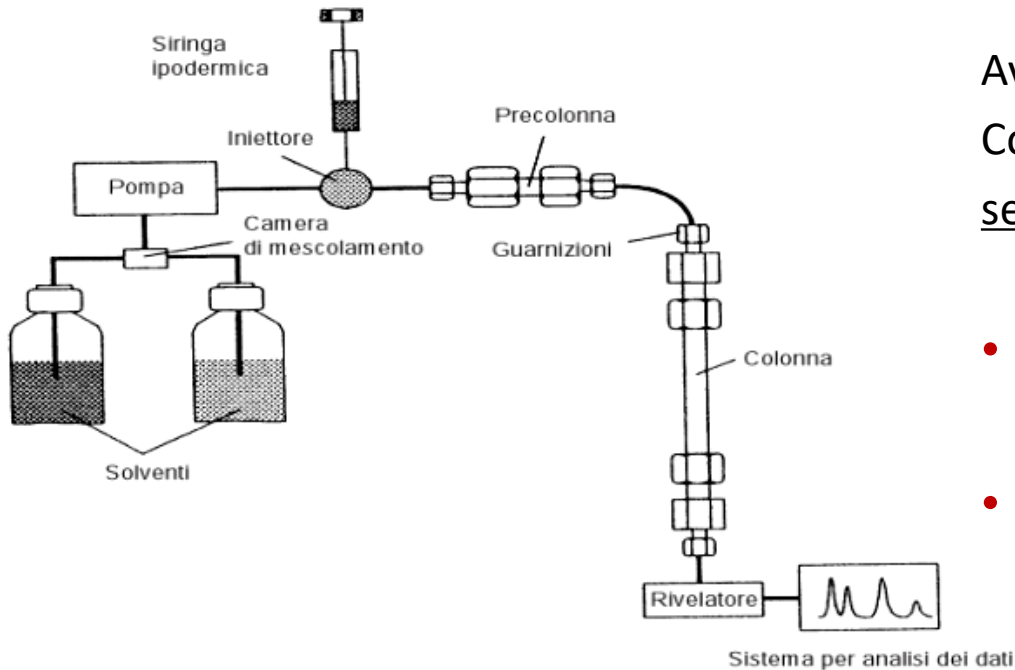
- **serbatoi dei solventi**
- filtro per solventi
- **pompa e valvola dosatrice** (P fino a 400 Atm, flusso stabile tra 0.1 e 10 mL/min)
- regolatore della pressione (flusso)
- degasatore (degaser)
- autocampionatore termostato (autosampler)
- **sistema di introduzione del campione** (injector)
- precolonna (guard column)
- **colonna cromatografica** (analytical column)
- sistema di termostatazione colonna
- **rivelatore** (detector)
- PC

CROMATOGRAFIA



CROMATOGRAFIA

Iniezione del campione



Avviene attraverso l'iniettore.
Consente l'introduzione del campione senza interruzioni significative di flusso.

- **caricamento o load**
- **iniezione o inject**

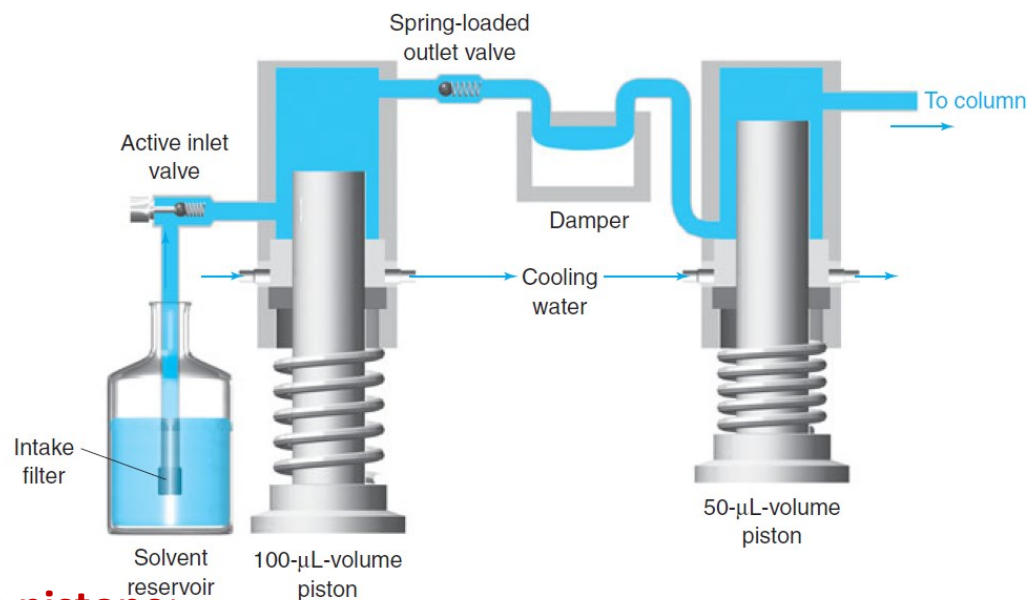


CROMATOGRAFIA

POMPE

v di flusso della FM tra 0,1 e 10 mL/min (riproducibile)

Resistenza alla corrosione, pistoni in ceramica o zaffiro.



Pompe alternative (pressione pulsata) a pistone:

più usate, sostengono stabilmente pressioni fino a 1000 atm: buone v di flusso e in un ampio intervallo

Pompe a siringa: flusso stabile, pressione non pulsata, ma meno potente

Pompe pneumatiche: pressione non pulsata ma poco potente

CROMATOGRAFIA

VANTAGGI

Ridotte dimensioni delle colonne

Velocità di analisi

Ottimizzazione dei tempi

Elevata sensibilità

Elevata risoluzione

Strumentazione standardizzata ed automatizzata

Analisi qualitative e quantitative

Le colonne sono riutilizzabili



SVANTAGGI

Elevati costi economici

Elevati costi manutenzione

Sistema HPLC completo ≈ 40.000 €

CROMATOGRAFIA


SCELTA DELLA FM

Il potere di eluizione di una fase mobile è legato alla sua polarità (proporzionale al momento di dipolo).

Si definisce forza dell'eluente, ϵ , rispetto ad una data fase stazionaria, il **calore di adsorbimento per unità di area di superficie dell'adsorbente**.

I solventi utilizzati sono classificati in ordine di polarità crescente, nella **serie eluotropica**, fissando una data fase stazionaria (in genere **silice** oppure **allumina**).

Serie eluotropiche dei più comuni solventi



silice	allumina
cicloesano	pentano
pentano	cicloesano
tetracloruro di carbonio	tetracloruro di carbonio
toluene (metilbenzene)	toluene (metilbenzene)
cloroformio	dietil etere
dietil etere	cloroformio
acetato di etile	acetato di etile
acido acetico	metanolo
metanolo	acido acetico

POLARITA'

CROMATOGRAFIA

SCALA ELUOTROPICA (fase stazionaria: **allumina**)

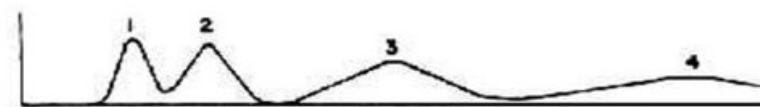
Solventi non miscibili in acqua		Solventi miscibili in acqua	
Solvente	ϵ	Solvente	ϵ
Pentano	0,0	Diossano	0,56
Etere	0,01	Acetone	0,56
Esano	0,01	Acetato di etile	0,58
Cicloesano	0,04	Dimetilsolfossido	0,62
Tetracloruro di carbonio	0,18	Acetonitrile	0,65
Xilene	0,26	Piridina	0,71
Toluene	0,29	i-propanolo	0,82
Clorobenzene	0,30	n-propanolo	0,82
Benzene	0,32	Metanolo	0,95
Etere etilico	0,38	Acido acetico	1,0
Cloroformio	0,40		
CH ₂ Cl ₂	0,42		
Tetraidrofurano	0,45		
Dicloroetilene	0,49		
Metiletilchetone	0,51		

CROMATOGRAFIA

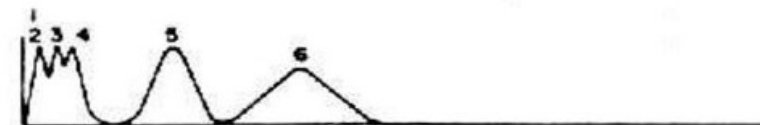
Quando i composti hanno polarità differenti, si effettua una corsa cromatografica in cui la miscela della fase mobile viene fatta variare secondo un gradiente di polarità, così da ottenere una migliore separazione dei componenti della miscela.

Analisi in gradiente di
solvente o in gradiente
di polarità.

**SOLVENTE
DEBOLE**



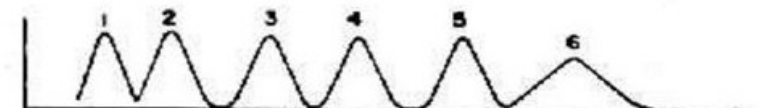
**SOLVENTE
FORTE**



**FORZA
INTERMEDIA**



**GRADIENTE
DI SOLVENTE**



CROMATOGRAFIA

RIVELATORI

Forniscono indicazioni sulla presenza e quantità dei composti in uscita dalla colonna. I più usati sono i **RILEVATORI OTTICI** (converte la luce in segnale elettrico).

Rivelatori ad assorbanza

Rivelatori a fluorescenza

Rivelatori a indice di rifrazione

Rivelatori elettrochimici

Rivelatori a spettrometro di massa

Risonanza Magnetica Nucleare

CROMATOGRAFIA RIVELATORI

Forniscono indicazioni sulla presenza e quantità dei composti in uscita dalla colonna. I più usati sono i **RILEVATORI OTTICI** (converte la luce in segnale elettrico).

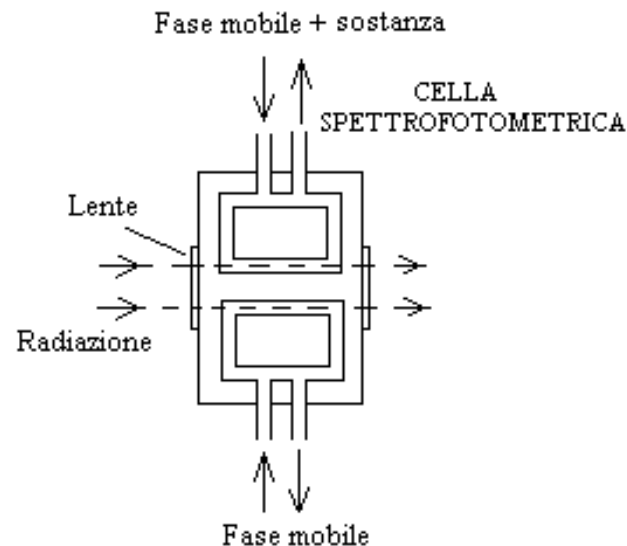
Detector	Approximate limit of detection ^a (ng)	Useful with gradient?
Ultraviolet	0.1–1	Yes
Refractive index	100–1 000	No
Evaporative light-scattering	0.1–1	Yes
Charged aerosol	1	Yes
Electrochemical	0.01–1	No
Fluorescence	0.001–0.01	Yes
Nitrogen ($\text{N} \xrightarrow{\text{combustion}} \text{NO} \xrightarrow{\text{O}_3} \text{NO}_2^* \rightarrow h\nu$)	0.3	Yes
Conductivity	0.5–1	No
Mass spectrometry	0.1–1	Yes
Fourier transform infrared	1 000	Yes

CROMATOGRAFIA

RIVELATORI ad ASSORBANZA

Sono i più diffusi, e sono costituiti da uno **spettrofotometro**, che può essere a **singola lunghezza d'onda** (spettrofotometro con tubo fotomoltiplicatore, i più semplici usano una lampada a mercurio con λ fissa: 254nm e con sensibilità tipica: 0.1 ppb), oppure può misurare tutto lo spettro della sostanza eluita in frazioni di secondo. (**spettrofotometro a serie di diodi**).

Si basano sull'assorbimento di luce nel *range* UV (più sfruttato)-Vis-NIR.



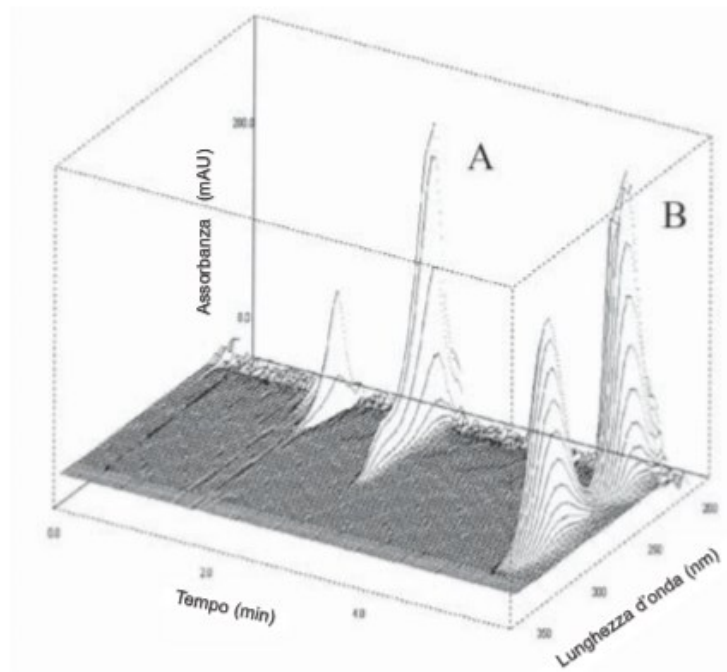
CROMATOGRAFIA

RIVELATORI AD ASSORBANZA a serie di DIODI

Consentono una **registrazione simultanea dello spettro in funzione della lunghezza d'onda utilizzando una serie di diodi** (componente elettronico a due terminali (bipolo), la cui funzione ideale è quella di permettere il flusso di corrente elettrica in un verso e di bloccarla quasi totalmente nell'altro).

Registrando lo spettro in tempo reale è possibile **confrontarlo con una libreria spettrale** che aiuta nell'identificazione del picco.

Si possono inoltre **ottenere grafici tridimensionali in funzione dell'assorbanza, della lunghezza d'onda e del tempo** dando nello stesso grafico una visione quantitativa oltre che qualitativa.



CROMATOGRAFIA

gruppo funzionale	cromoforo	λ (nm)	ϵ
aldeide	- CHO	210, 280-300	1500; 11-18
ammina	- NH ₂	195	2800
aromatico: antracene benzene bifenile naftalene piridina	C ₆ H ₆	252; 375 184; 202; 255 246 220; 275; 312 174; 195; 251	199000-7900 46700; 6900; 170 20000 80000; 4000; 3500
azide	- C=N -	190	5000
azo	- N=N -	285-400	3-25
bromuro	- Br	208	300
carbossilico	- COOH	200-210	50-70
chetone	- C=O	195; 270-285	1000; 15-30
disolfuro	- S-S -	194; 255	5500; 400
estere	- COOR	205	50
etere	- O -	185	1000

CROMATOGRAFIA

gruppo funzionale	cromoforo	λ (nm)	ϵ
insaturazione: alifatica alicyclica		210-230	21000
		230-260	3000-8000
insaturazione coniugata	- (C=C) ₃ -	260	35000
	- (C=C) ₄ -	300	52000
	- (C=C) ₅ -	330	118000
insaturazione isolata: doppio legame triplo legame	- C=C -	190	8000
	- C \equiv C -	175-180	6000
ioduri	- I	260	400
nitrate	- ONO ₂	270	12
nitrile	- C=N	160	-
nitrite	- ONO	220-230; 300-400	1000-2000; 10
nitro	- NO ₂	210	forte
nitroso	- NO	302	100
ossima	- NOH	190	5000
solfo	- SO ₂	180	-
solfoossido	- S - O	210	1500
tiochetone	- C=S	205	forte
tioetere	- S -	194; 215	4600; 1600
tio	- SH	195	1400

CROMATOGRAFIA

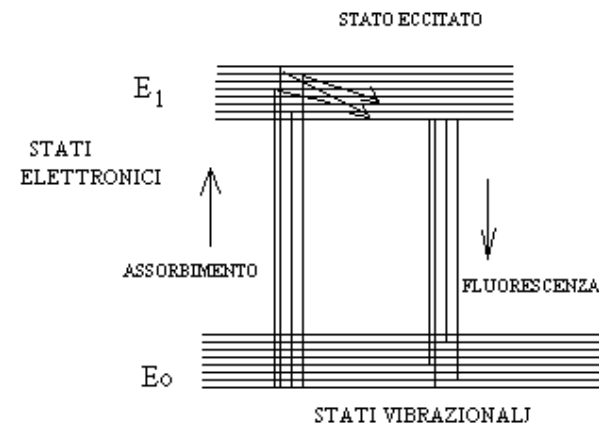
Si misura contemporaneamente l'assorbimento della miscela (FM + soluto da analizzare) e quello della FM così da registrare, per differenza, solo l'assorbimento della sostanza eluita. Per ottenere il risultato analitico è essenziale che i SOLVENTI della FM non assorbano la radiazione UV.

solvente	λ di cut off	solvente	λ di cut off
acetato di etile	244	eptano	200
acetone	330	esano	200
acetonitrile	190	etere dietilico	220
benzene	280	metanolo	205
butan-2-olo	260	metil- <i>i</i> butilchetone	335
carbonio tetracloruro	265	pentano	200
carbonio dicloruro	235	piridina	330
cloroformio	245	propan-1-olo	210
cicloesano	200	tetraidrofurano	210
dimetilsolfossido	270	toluene	285
diossano	215	<i>o</i> -Xilene	285

CROMATOGRAFIA

RIVELATORI A FLUORESCENZA

Si basano sulla proprietà di alcune sostanze eccitate da una radiazione di una certa energia di emettere radiazioni di energia inferiore. **L'emissione di radiazioni da parte di specie molecolari eccitate con radiazioni UV-VIS, si chiama fluorescenza (o fosforescenza, se lo stato eccitato permane anche quando termina la radiazione eccitatrice).**

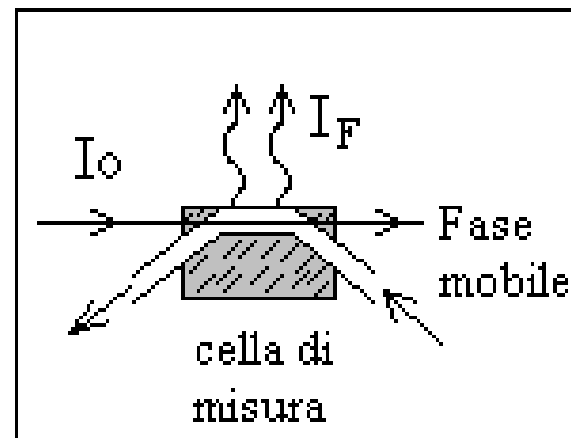


CROMATOGRAFIA

RIVELATORI A FLUORESCENZA

La **sorgente** è costituita da una **lampada ad arco di Xenon**. A differenza di uno spettrofotometro UV–VIS, lo strumento contiene **due monocromatori**. Il primo si chiama **monocromatore di eccitazione** e seleziona la radiazione eccitatrice, il secondo che si chiama **monocromatore di emissione**, seleziona le lunghezze d'onda da misurare. Il **rivelatore** è costituito da un **tubo fotomoltiplicatore**.

La fase mobile, contenente il soluto da analizzare, viene investita da una radiazione (I_0) di lunghezza d'onda fissa (corrispondente al massimo di assorbimento del soluto) e si misura l'intensità della radiazione emessa (I_F) sotto un angolo di 90° rispetto alla radiazione incidente (**fenomeno di fluorescenza**).



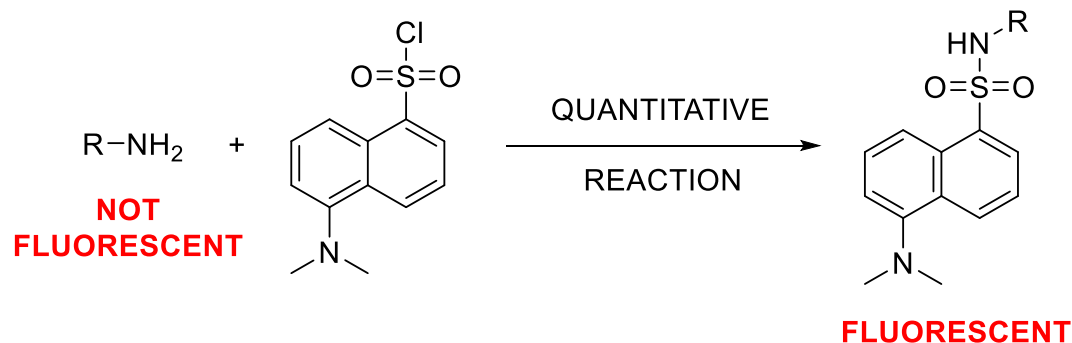
CROMATOGRAFIA

RIVELATORI A FLUORESCENZA

Hanno maggiore sensibilità e selettività rispetto a quelli ad assorbanza.

Hanno minore campo di applicabilità ma è possibile formare derivati fluorescenti (reazioni di derivatizzazione).

Es: dansil-cloruro per ammine e AA.

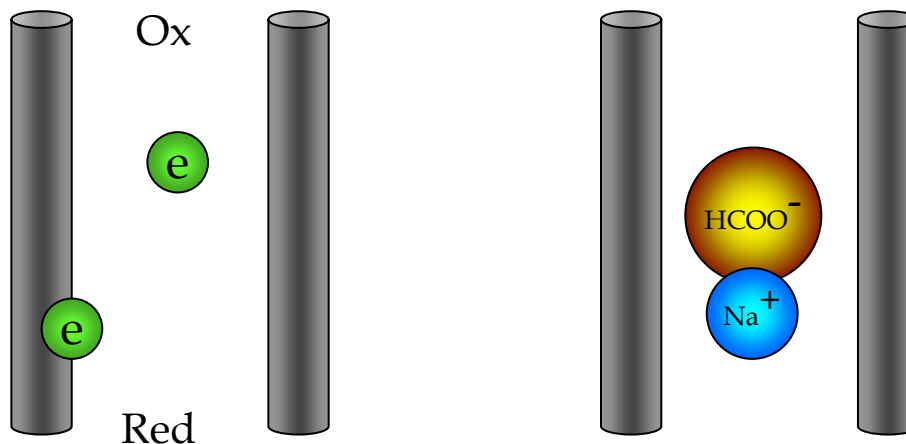


CROMATOGRAFIA

RIVELATORI ELETTROCHIMICI

1. *Rivelatore conduttimetrico*: misura la *conduttanza* ($\Lambda = 1/R$, in Siemens) di soluzioni ioniche (proporzionale alla mobilità degli ioni).

2. *Rivelatore amperometrico*: misura l'*intensità* ($I = V/R$, in Ampere) della corrente prodotta dalle *reazioni redox* di soluzioni di elettroliti.



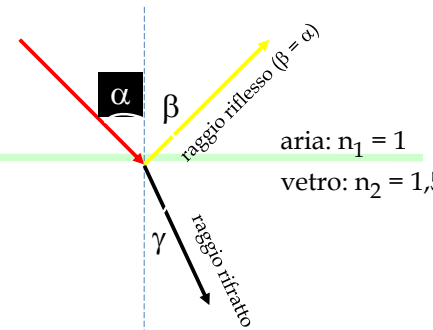
CROMATOGRAFIA

RIVELATORI A INDICE DI RIFRAZIONE

Rivelatore **universale** basato sulla **variazione dell'indice di rifrazione del soluto rispetto alla fase mobile**, ma il suo **limite di rilevabilità è circa 1000 volte inferiore a quello del rivelatore di assorbimento nell'UV**.

Usato sostanze non attive nell'UV-Vis. Non risente delle variazioni di flusso, bensì della T.
Non può essere utilizzato per separazioni in gradiente.

Questo tipo di rivelatore si basa sulla differenza dell'indice di rifrazione tra **FM** e **"FM + soluto"**. Una sorgente a tungsteno (che emette nella regione del vis) invia una radiazione in una cella costituita da due compartimenti: nel primo passa solo la **FM**, nel secondo la miscela (**FM + soluto**). Poiché i due liquidi hanno indici di rifrazione differente, il raggio sarà deviato in misura differente. A causa della deflessione, una parte del raggio riflesso dallo specchio non giungerà al rivelatore, che registrerà una diminuzione dell'intensità. Tale diminuzione è proporzionale alla concentrazione del soluto presente nella fase mobile.



1222 · 2022
800
ANNI



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA