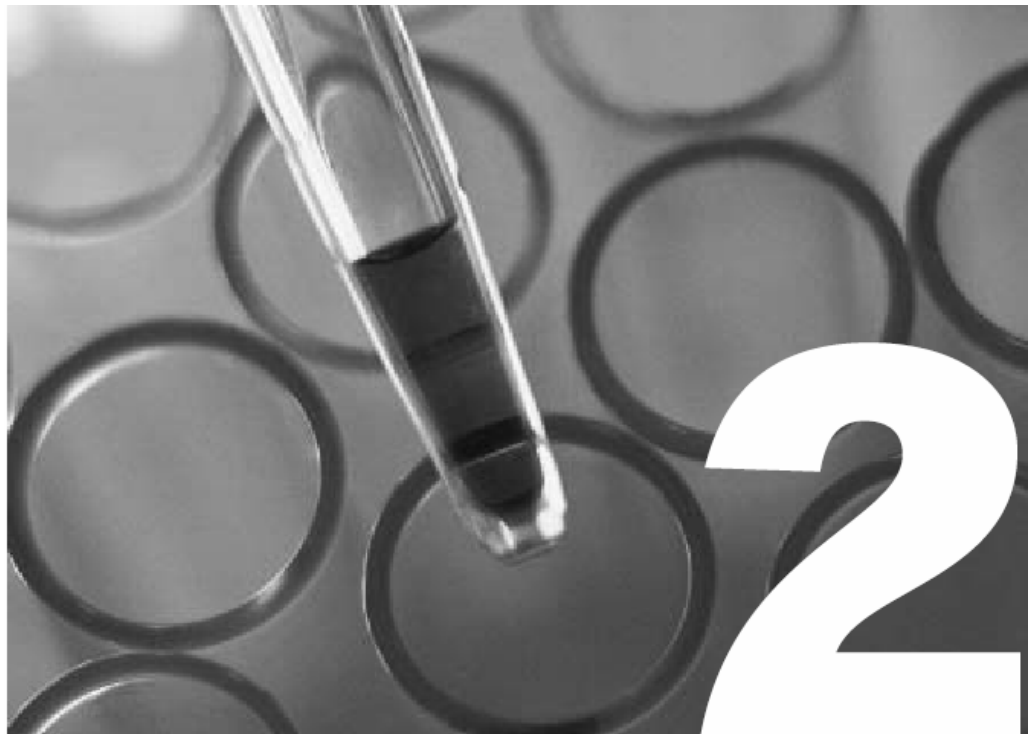


**PARTE SECONDA – CROMATOGRAFIA PREPARATIVA IN COLONNA:
TEORIA E PRATICA**



1 Punto di Partenza – Definizione del Problema

Le proprietà del campione e l'uso di composti purificati dettano la procedura di purificazione da seguire. Quindi, ogni separazione dovrebbe essere pianificata con attenzione e gli obiettivi chiaramente identificati prima di iniziare, in maniera da evitare errori di base e per fare il miglior uso possibile delle risorse disponibili per una purificazione ottimizzata.

1.1 Campione

Diverse caratteristiche di un campione devono essere prese in considerazione prima di tentare la purificazione. La più importante è la solubilità del campione. Bisogna assicurarsi che il campione sia completamente solubile nella fase mobile; altrimenti si aggregherà nella colonna e renderà infruttuosi i tentativi di purificazione.

Altri importanti aspetti devono essere considerati, come

- l'origine (la miscela della reazione di sintesi, l'estratto grezzo biologico)
- la composizione (nota o ignota)
- la matrice (le proprietà fisiche e chimiche)
- la fase (gas, liquido o solido)
- la concentrazione della sostanza di interesse (in tracce, uno o più dei componenti principali)

La stabilità del campione è pure di enorme importanza. Il campione si può degradare in colonna, o essere sensibile all'ossigeno o alla luce.

Una ricerca in letteratura può orientare verso il sistema più appropriato e le condizioni da usare con un campione noto.

Un pre trattamento semplice (come ad esempio una filtrazione o una estrazione) può spesso essere utile a rimuovere il materiale non voluto dalla miscela originale, come i residui del catalizzatore o la matrice di reazione e quindi rendere più semplice la separazione cromatografica. Questo è ancora più importante quando si lavora con gli estratti biologici e a quando si lavora con colonne costose (RPC).

Queste considerazioni legate alla natura del campione decidono se il campione richiede un condizionamento o un pretrattamento prima dell'applicazione sulla colonna cromatografica.

1.2 Purezza

La purezza di un campione è limitata dall'abilità di identificare le impurità presenti per mezzo dei mezzi analitici disponibili.

La purezza richiesta e le costrizioni dell'ulteriore processo del composto isolato (o composti isolati) governano le condizioni con cui la separazione cromatografica verrà effettuata. Quando si purifica la sostanza da usare come standard di riferimento o come composto da testare su animali, la purezza deve essere oltre il 99%. Di solito, maggiore la purezza da ottenere, più il profilo di separazione dovrebbe essere seguito da vicino e maggiore l'attenzione con cui la procedura dovrebbe essere portata avanti. Nel caso ideale, alcune separazioni cromatografiche dovrebbero portare subito ad una purezza sufficiente senza che ci sia bisogno di troppe preoccupazioni.

1.3 Altri fattori

Altri fattori logistici influenzeranno i parametri della procedura quando si pone la scelta fra condizioni diverse. Tali fattori sono: il tempo richiesto (per massimizzare l'efficienza del processo); la difficoltà della procedura; il costo; la sicurezza (legata al tipo di solventi usati); la frequenza della procedura e la capacità del sistema.

La preoccupazione della sicurezza non deve essere sottovalutata.

Il pericolo di solito è dato dai solventi usati e dal campione. Dato che l'uso di grandi quantità di solvente può a volte essere evitata tramite la cromatografia su scala preparativa, le quantità giocano un ruolo rilevante quando si deve valutare la tossicità del solvente. Una attenta valutazione dei materiali pericolosi contenuti nel residuo dovrebbe essere effettuata prima di buttare via qualunque campione nella raccolta rifiuti.

Anche la capacità del sistema e le quantità da sottoporre al processo devono essere prese in considerazione per limitare i costi della procedura.

Fondamenti – I principi di Base

2.1 Informazioni Generali

La cromatografia è un metodo potente ed usato in maniera estensiva per le separazioni chimiche.

La migrazione di una miscela da una reazione o da sistemi più complessi (cioè estratti grezzi biologici) insieme ad una fase mobile come “carrier” su una superficie fissa di sostanza ritardante e nelle condizioni appropriate promuove la separazione della miscela nei propri singoli componenti. Virtualmente ogni miscela che può essere solubilizzata può essere separata nei propri singoli componenti per cromatografia.

La cromatografia è usata per separare miscele su scala preparativa ed è estensivamente usata per scopi analitici come l'identificazione e la valutazione quantitativa di una sostanza.

È lo scopo della separazione, piuttosto che la quantità del campione che viene separato a determinare la natura analitica o separativa del processo.

La cromatografia preparativa di solito è effettuata su quantità in larga scala, con il campione che satura la fase stazionaria. Questo porta a requisiti diversi per i meccanismi analizzatori. I detectors analitici avranno bisogno di grande sensibilità, che sarebbe saturata su scala preparativa.

I detectors preparativi devono essere in grado di gestire un grosso flusso, laddove un'alta sensibilità non ha un ruolo troppo importante.

La purificazione preparativa arricchisce o purifica uno o più componenti ed inoltre implica l'uso successivo del materiale purificato, mentre la cromatografia analitica punta l'attenzione soprattutto sul cromatogramma o sulle “impronte digitali” necessarie per l'identificazione e solitamente non è interessata alla fine fatta dal campione.

2.2 Cromatografia di Adsorbimento

Le separazioni cromatografiche fanno uso della capacità da parte dei composti, di essere adsorbiti, ovvero di aderire alle superfici. L'adsorbimento è una interazione di legame fra una sostanza in soluzione e una sostanza solida.

La cromatografia di adsorbimento è fondamentalmente interessata alle interazioni deboli, e quindi reversibili, tra due fasi. La formazione di questi legami deboli si chiama adsorbimento, mentre ci si riferisce alla rottura di questi legami come desorbimento.

2.2.1 Meccanismi di Separazione nella Cromatografia di Adsorbimento

L'adsorbimento è basato sulle seguenti interazioni:

a) *Interazioni di dipolo*

Durante il legame fra due atomi ad elettronegatività differente, c'è una disposizione asimmetrica della coppia elettronica di legame.

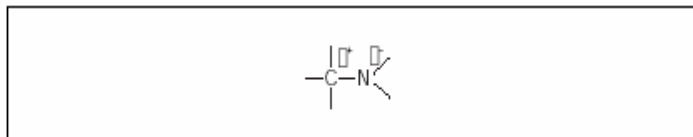


Figura 1:
Dipolo

L'atomo più elettronegativo attrae a sé la coppia elettronica di legame; si forma un dipolo di legame, del quale può essere misurata la forza. La distribuzione di carica nel legame fra atomi polari è evidenziata dai simboli δ^+ e δ^- .

Nella tavola periodica degli elementi, l'elettronegatività, cresce da sinistra a destra e decresce dall'alto in basso.

b) Legami a ponte d'idrogeno

I ponti ad idrogeno sono legami di natura prevalentemente elettrostatica fra un atomo di H di una molecola legato ad un elemento fortemente elettronegativo ed un altro atomo fornito di almeno un doppietto non condiviso (F, O, N, S). Tali aggregati sono stabili nello stato solido ma instabili in soluzione.

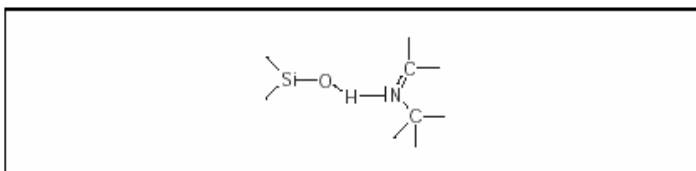


Figura 2:
Legame ad idrogeno

c) Complessi π

Il complesso π si forma quando un partner elettrofilo con una carenza elettronica (X^+) attacca un doppio legame C=C ricco di elettroni. Il risultante addotto libero è chiamato complesso π .

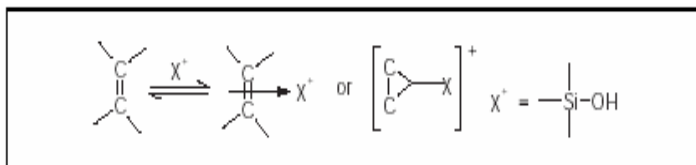


Figura 3:
Complesso π

Nel caso del gel di silice, il partner attivo nella cromatografia d'adsorbimento è il gruppo silanolo, mentre nell'allumina questa funzione è esercitata dai centri Al e dagli atomi di O.

d) Complessi di trasferimento di carica

Ci si riferisce in particolare ai complessi π come a complessi di trasferimento di carica. In questo caso, c'è un'interazione fra sistemi in cui il contenuto elettronico è stato fortemente ridotto (per esempio come risultato di effetti di ionizzazione) e un altro sistema con elettroni π adatto.

e) Effetti sterici

A parte i meccanismi e le interazioni descritti sopra, anche gli aspetti sterici delle molecole giocano un ruolo importante.

Quindi, le molecole con strutture che differiscono stericamente (isomeri) possono generalmente essere (facilmente) separate per cromatografia di adsorbimento.

2.3 Cromatografia di Esclusione Dimensionale

La cromatografia su gel è una tecnica di separazione che si differenzia in maniera sostanziale nel principio di separazione rispetto a tutti gli altri metodi cromatografici.

Laddove l'effetto di separazione di altri metodi cromatografici è basato su un'interazione fra la sostanza da separare e la fase stazionaria da una parte, e la fase mobile dall'altra, la separazione nella cromatografia su gel dipende dalla dimensione delle molecole.

L'origine della cromatografia su gel è basata sul lavoro condotto da J. Porath e P. Flodin. Una loro pubblicazione del 1959 mostrò che i gel di polidestranò reticolato rigonfiati in acqua hanno la capacità di separare miscele macromolecolari solubili in acqua e che la separazione ha quindi luogo a seconda delle dimensioni della molecola. Nel 1964, J.C. Moore pubblicò i risultati che dimostravano che il gel di polistirene reticolato rigonfiato in solventi organici, poteva essere usato per la separazione di polimeri sintetici. Questo diede vita alla moderna cromatografia di "*gel permeation*".

Rispetto a quei tempi, ci sono stati molti sviluppi in questo campo.

Una considerabile attenzione è stata rivolta specificamente allo sviluppo di nuovi gel. I gel usati da Porath, Flodin e Moore erano reticolati in maniera leggera, permettendo quindi solo carichi a bassa pressione e bassi flussi. A pressioni più alte le singole particelle di gel venivano compresse e non funzionavano più.

Successivamente, vennero prodotti nuovi gel più reticolati e con una migliore stabilità meccanica. Questo ha reso possibile oggi l'aumento del flusso, e quindi la riduzione dei tempi di separazione. Oggi l'utente della cromatografia su gel può scegliere fra una vasta gamma di gel per le applicazioni più varie.

Le fasi stazionarie per la cromatografia di esclusione dimensionale consistono di granelli porosi, in cui i pori individuali hanno diverso diametro.

Se una colonna cromatografica è impaccata con tale fase stazionaria, la fase mobile fluisce attraverso le aree individuali ed attraverso i pori. Se una miscela di sostanze che comprende molecole di dimensioni differenti è caricata su una colonna preparata in questa maniera, le molecole più grandi che non possono permeare i pori sono trasportate dalla fase mobile attraverso gli spazi intermedi fra i granelli individuali verso l'uscita della colonna. Sono quindi escluse (da cui il nome Size Exclusion Chromatography, o SEC, cioè Cromatografia di Esclusione Dimensionale) ed eluite per prime. Il loro volume di eluizione corrisponde al volume del granello intermedio usato in colonna ($=V_z$). Le altre molecole sono in grado di permeare i pori; le molecole più piccole permeano tutti i pori (= permeazione totale), quelle più grandi permeano solo quelli con un diametro corrispondente (permeazione selettive). Le molecole sono trasportate attraverso i pori in maniera primaria per diffusione, così che tali molecole escono in ritardo rispetto al flusso del solvente. Più piccolo è il diametro dei pori, maggiore il ritardo. I componenti individuali escono quindi dalla colonna in ordine decrescente di peso o dimensione molecolare, con le molecole più piccole per ultime. Questo volume di eluizione corrisponde al volume morto della colonna ($=V_0$) già visto in altri tipi di cromatografia. Questa procedura può essere illustrata schematicamente come segue:

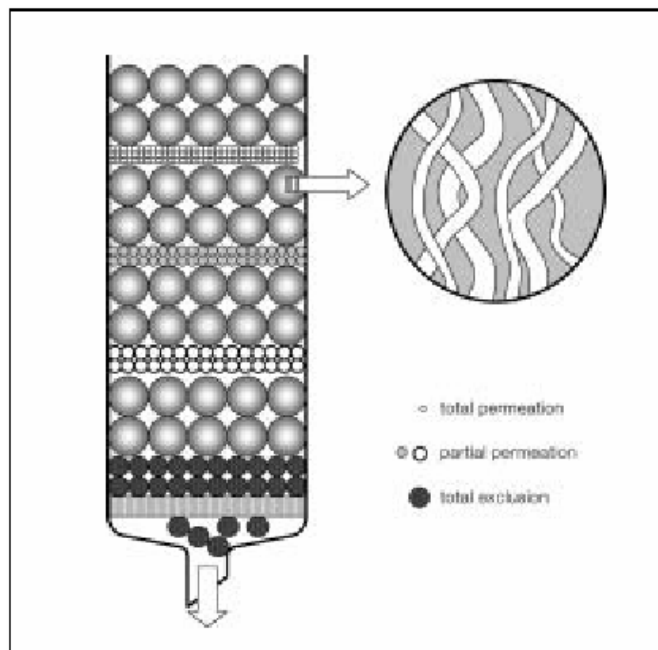


Figura 4:
Rappresentazione schematica della separazione per esclusione dimensionale

Il volume del liquido disponibile per la separazione corrisponde al volume dei pori della colonna (= il volume di permeazione V_p), e la relazione è:

$$V_r = V_0 - V_z$$

Tutte le molecole piccole che sono in grado di permeare i pori più stretti escono col volume v_0 . Se le altre molecole sono in grado di fare lo stesso, non vengono separate.

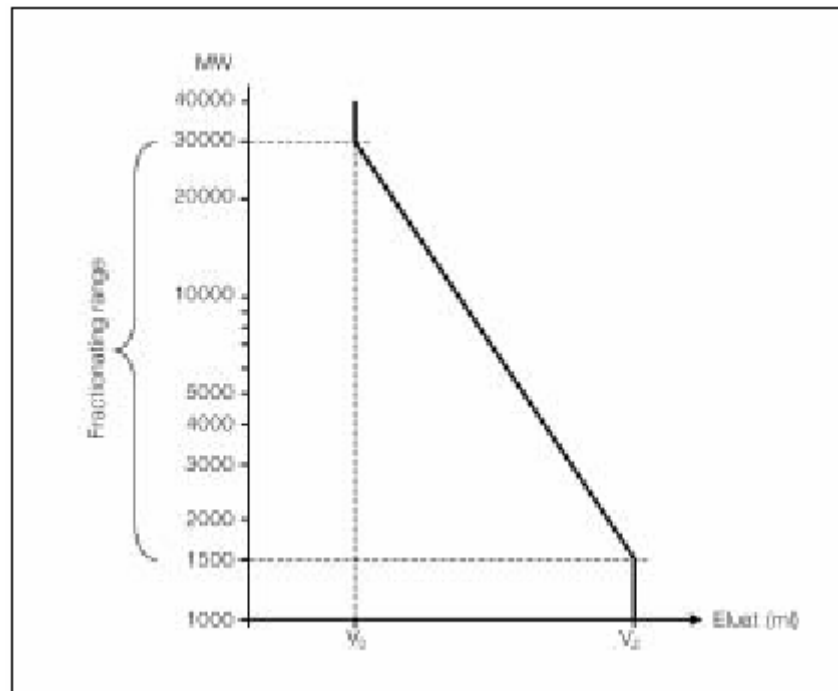
Se, comunque, le sostanze continuano ad uscire dalla colonna dopo il volume v_0 , allora questo è indice di una reazione fra la sostanza e la fase stazionaria (cioè adsorbimento).

Ogni gel può separare sostanze all'interno di una particolare gamma di dimensioni molecolari.

È essenziale conoscere tale intervallo, allo scopo di poter valutare l'applicabilità di un gel allo scopo prescelto.

Se il logaritmo della massa molare è rappresentato per ogni gel: si ottiene una curva caratteristica per ogni gel:

Figura 5:
Curva di separazione
caratteristica per una
cromatografia ad
esclusione
dimensionale.



2.4 Cromatografia a Scambio Ionico

Nella cromatografia a scambio ionico, il soluto con una carica elettrostatica si lega ad una matrice insolubile e chimicamente inerte con carica opposta. La matrice (M) contiene piccoli controioni (C) che sono in competizione reversibile con le molecole in soluzione (S). In questo modo, l'equilibrio può essere formulato come segue:



*Equazione 2:
equilibrio della
cromatografia a scambio
ionico.*

L'eluizione è ottenuta con una soluzione molto concentrata di sale (o con un gradiente di eluizione), o per cambio di pH.

Ci sono due tipi di scambio possibili:

- Scambio anionico, dove la matrice (M⁻) si lega o al proprio controione carico negativamente (C⁻) e poi viene eluita da soluti carichi negativamente (S⁻).



*Equazione 3:
equilibrio di scambio
anionico.*

- Scambio cationico, dove la matrice (M⁺) si lega o al proprio controione carico positivamente (C⁺) e poi viene eluita da soluti carichi positivamente (S⁺).



*Equazione 4:
equilibrio di scambio
cationico*

2.5 Cromatografia di Affinità

La cromatografia di affinità sfrutta le interazioni altamente specifiche fra due molecole partner (soprattutto composti biologici, cioè proteine). Questo legame fortemente specifico fra una proteina ed il suo ligando è forte ma noncovalente. Il gel di affinità è ottenuto attaccando il ligando ad una matrice di affinità inerte, che dovrebbe avere un'alta porosità ed essere in grado di essere facilmente modificata (di solito un gel di esclusione dimensionale).

In questi casi, l'agaroso è la matrice più ampiamente usata.

Nel caso ideale, dove una proteina impura è fatta correre attraverso la colonna di affinità, solo la proteina desiderata si lega al gel attraverso un legame specifico col ligando immobilizzato. Le molecole di proteine che si sono legate possono essere spostate dalla colonna (eluizione) facendo fluire una soluzione con condizioni alterate (ad esempio un'alta concentrazione di sale, un basso pH, un'alta concentrazione di una sostanza in competizione per il binding).

3 Fase Stazionaria

3.1 Generalità

Il meccanismo di separazione può essere diviso in due categorie: l'interazione attrattiva (adsorbimento, partizione, l'attrazione elettronica), e la permeazione non-attrattiva (separazione per dimensioni e/o forma).

Il metodo di separazione, sia per affinità del soluto o per le sue dimensioni/forma, è il primo punto da considerare quando si sceglie la fase stazionaria. Naturalmente, alcuni materiali di riempimento fanno uso di entrambe le categorie per migliorare l'efficienza della separazione (cioè le colonne per la cromatografia di affinità contengono dei ligandi di affinità legati a gel di esclusione dimensionale).

L'instabilità chimica o la degradazione del materiale delle colonne è sempre possibile e può portare alla contaminazione del campione. Questa contaminazione può anche essere dovuta ad impurità presenti all'interno dell'impaccamento della colonna. Questo avviene, ad esempio, con impaccamenti contenenti legami silossano (<Si-O-Si<). Questo legame, formato per reazione reversibile, è termicamente stabile, ma è suscettibile all'idrolisi, che è aumentata in condizioni acide o basiche. Ad esempio la purificazione di peptidi su colonne C-18 favorisce in maniera particolare questa idrolisi acida.

Idealmente, il percorso casuale delle molecole sulla superficie cromatografica dovrebbe essere uguale per lunghezza e velocità per molecole diverse, ma ciò non avviene mai in pratica, ed i parametri chiave da considerare, quando si progetta una colonna LC, includono le dimensioni delle particelle, la forma, la porosità, l'area superficiale accessibile, la stabilità meccanica, il costo e la disponibilità. Materiali di adsorbimento possibili sono SiO_2 , Al_2O_3 , CaCO_3 , cellulosa, poliammide, talco, zucchero, MgO , CaO , ...

Diversi materiali di adsorbimento dovrebbero essere testati con differenti corse in TLC, iniziando dalla silice e sapendo che i gel di silice spesso portano al risultato desiderato.

3.2 Silice a Fase Normale

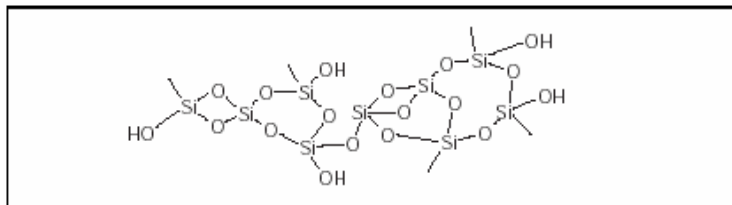
Le proprietà polari (idrofobiche o idrofiliche) del campione o dei composti da separare governano la scelta del materiale adsorbente. La fase stazionaria più appropriata, così come la fase mobile più soddisfacente, dovrebbero essere identificate per mezzo di corse su piccola scala in TLC analitica. Questo metodo non richiede molto tempo, è relativamente poco costoso e consuma molto poco campione di partenza. Di solito si trovano lastre TLC con lo stesso adsorbente del materiale di riempimento delle colonne.

Le separazioni cromatografiche con una fase stazionaria che è più polare del solvente sono considerate cromatografia di adsorbimento "normale".

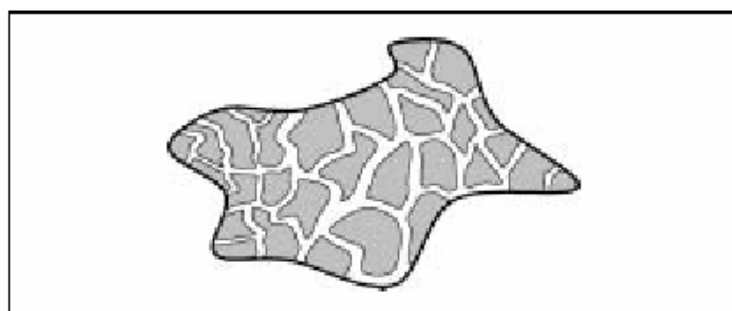
La silice, con varie porosità e dimensioni delle particelle, è l'adsorbente più ampiamente usato per questo scopo e dovrebbe essere la prima scelta per corse di prova. In alcuni casi si usano gel di alluminio o, in casi speciali, poliamidi.

Da un punto di vista chimico, il gel di silice consiste in atomi di silicio che sono legati da atomi di ossigeno a formare reti tridimensionali.

La particella individuale di gel di silice è una struttura porosa in cui gli atomi di silicio terminali sono saturati con gruppi OH (acido silicico), e questo accade lungo tutta la superficie, anche nei pori.



*Figura 6:
Struttura chimica
del gel di silice.*



*Figura 7:
Pori nella fase
stazionaria.*

Oggi sono disponibili per la cromatografia preparativa gel di silice con dimensioni dei pori di 40, 60 e 100 Å (Si-40, Si-60 e Si-100).

Si-60 va bene per la maggior parte delle applicazioni. Una dimensione dei pori troppo piccola a volte può portare in certi casi ad un effetto di esclusione.

Il gel di silice è leggermente acido, ed è stabile in una gamma di pH da circa 1 a 9. Dunque, i componenti alcalini possono mostrare "scodate" più o meno pronunciate in solventi neutri. La densità di massa è di circa 0.4-0.6 g/cm³, e la densità vera e propria è di circa 2.2 g/cm³.

Il range delle dimensioni delle particelle varia, a seconda dei diversi produttori.

Per la cromatografia preparativa su scala da laboratorio, sono raccomandate dimensioni di 15-25 µm, 25-40 µm o 40-63 µm e simili. Queste dimensioni delle particelle forniscono buona efficienza di separazione accoppiata con una resistenza al flusso (contro-pressione) che non è troppo alta.

Le dimensioni delle particelle, la forma, la densità e la resistenza alla compressibilità hanno un ruolo prominente nella permeabilità del letto, nella stabilità e nell'efficienza della colonna.

Più piccola è la particella adsorbente, migliore è la separazione, ma anche maggiore la resistenza al flusso e quindi il tempo necessario per effettuare una completa separazione.

Una colonna impaccata in maniera troppo compatta, senza quasi nessun volume interstiziale in cui la fase mobile possa passare, vedrà l'efficienza limitata dalla necessità di un flusso ridotto.

L'uso di un materiale di impaccamento con una buona forza meccanica e dalla forma arrotondata dovrebbe essere preferito a quello di materiali friabili, comprimibili piatti o fibrosi.

Figura 8:
Sequenza di
eluizione in gel di
silice.



Per la cromatografia preparativa su scala di laboratorio, sono raccomandate particelle con dimensioni fra 15 e 63 μm . Esse combinano buona efficienza separativa con pressione di flusso accettabile (contro-pressione).

Oggigiorno, le particelle adsorbenti preparative hanno pori di 40, 60 e 100 \AA , con la misura di 60 \AA molto adatta per la maggior parte degli scopi. Il diametro delle particelle (d_p) non è precisamente definito, ma piuttosto rappresentato da una distribuzione delle dimensioni delle particelle. È stato riscontrato, in pratica, che un compromesso ottimale fra l'efficienza della colonna ed i costi di impaccamento è ottenuto con particelle di diametro che, differiscono, dal più piccolo al più grande di un fattore di 2 per $d_p \geq \sim 20 \mu\text{m}$ (cioè 15-25 μm , 25-40 μm , 40-63 μm etc.) [ref. Dewaele e Verzele]

I gel di silice permettono una separazione efficace di un'ampia gamma di composti. La sequenza di eluizione per i gel di silice può essere riassunta come segue: alcani \rightarrow olefine \rightarrow composti alogenati aromatici/organici \rightarrow solfuri \rightarrow eteri \rightarrow composti nitro \rightarrow esteri/aldeidi/chetoni \rightarrow alcoli/ammine \rightarrow solfoni/solfossidi \rightarrow ammidi \rightarrow acidi carbossilici.

La silice è una buona scelta per composti che differiscono solo per la posizione di un gruppo funzionale abbastanza polare (ad esempio l'idrossitetraidrofenantrene) o per la struttura vicina all'estremità polare di una molecola abbastanza non-polare (cioè esteri del colesterolo). È stato dimostrato che è la scelta migliore per la fase stazionaria quando si separano piccole molecole organiche ($PM < 2000$). Per di più, la silice offre una alta capacità di carico ed una forte resistenza meccanica con costi relativamente bassi.

3.3 Allumina

Da un punto di vista chimico, l'allumina è una rete di atomi di alluminio ed ossigeno.

I punti attivi sono sia sui centri Al^{3+} e gli atomi di O^{2-} connessi. L'allumina naturale è basica, ma può essere ottenuta in forma neutra o acida. In generale, l'allumina neutra è usata per la cromatografia d'assorbimento, per esempio per la separazione di anelli aromatici fusi o di composti che sono isomeri strutturali.

Comunque, dato che il pericolo di chemisorbimento (legame irreversibile della sostanza con l'adsorbente) è maggiore nel caso dell'allumina che in quello della silice, l'allumina è usata oggi virtualmente solo per scopi speciali, specialmente dato che le sostanze menzionate prima possono, in generale, essere separate facilmente su silice. Inoltre, l'efficienza separativa di una colonna di allumina è minore di quella di una colonna di gel di silice corrispondente. L'allumina è disponibile con dimensioni delle particelle simili a quelle del gel di silice. La densità di massa è di circa 0.9 g/cm^3 , e la densità è di circa 4.0 g/cm^3 . Per l'allumina neutra, la sequenza di eluizione corrisponde largamente a quella del gel di silice.

3.4 Poliammidi

Le poliammidi, in genere, non sono materiali adatti per l'adsorbimento. A causa della loro pronunciata abilità di formare ponti ad idrogeno, sono considerate fra gli adsorbenti che hanno un'azione specifica, e perciò sono usati soprattutto per la separazione di fenoli, zuccheri e sostanze simili.

3.5 Silice a Fase Inversa

Per altri tipi di campione più idrofobici, come i peptidi, la RPC è il metodo migliore (sempre che la denaturazione non sia un problema) utilizzando silice C-18 (o, in misura minore, C-8 e C-4).

In contrasto con la normale cromatografia di adsorbimento, nella cromatografia a fase inversa la fase stazionaria è meno polare della fase mobile. Le fasi stazionarie usate sono gel di silice modificati chimicamente. Così gli impaccamenti a fase inversa hanno caratteristiche fisiche molto simili, quando non identiche, ai gel di silice a fase normale.

In queste sostanze, gruppi organici non polari, in generale radicali octadecil (C-18) o octil (C-8), sono legati ai gruppi silanolo del gel di silice. Il legame avviene tramite il legame, molto stabile, Si-O-Si-C.

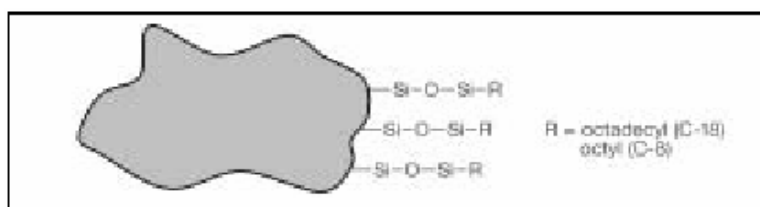


Figura 9:
Silice RP

Figura 10:
Sequenza di eluizione
su fase inversa



In aggiunta ai gruppi menzionati, che sono i più comuni, si possono ottenere anche altre fasi modificate, per esempio quelle che possiedono gruppi fenile o cicloesano. In tali fasi, l'interazione ha luogo fra la specie idrofobica della molecola e il gruppo non polare della fase stazionaria.

La sequenza di eluizione in colonne a fase inversa è circa la seguente: acidi carbossilici → alcoli/fenoli → ammine → eteri/aldeidi → chetoni → composti organici alogenati → alcani.

Esprimendosi in termini più generali, questo significa che, nel caso di materiali a fase inversa, le sostanze prontamente solubili in acqua sono eluite più rapidamente di quelle idrofobiche. Sebbene le fasi inverse siano più care dei normali gel di silice, esse, rispetto a queste ultime, palesano determinati vantaggi, come:

- Nessun deattivatore è richiesto nel solvente (e non è presente nessun centro con attività differenti, vedi anche la sezione 5),
- equilibrio stabilito rapidamente,
- soluzioni acquose, per esempio estratti, possono essere usate direttamente senza difficoltà, e
- buona separazione nel caso di componenti polari.

3.6 Cromatografia di Esclusione Dimensionale

I gel ad esclusione dimensionale basati sul destrano, sull'agaroso e sulla poliacrilammide (Sephadex, Sepharose, Fraktogel, Bio-Gel, ...) sono usati per separare sostanze con proprietà simili o identiche a seconda delle loro dimensioni.

I gel per cromatografia su gel "classica" sono basati sul destrano sull'agaroso e sulla poliacrilammide. Tali tipi sono classificati fra i gel "soffici" e quindi hanno una sensibilità più alta o più bassa alla pressione.

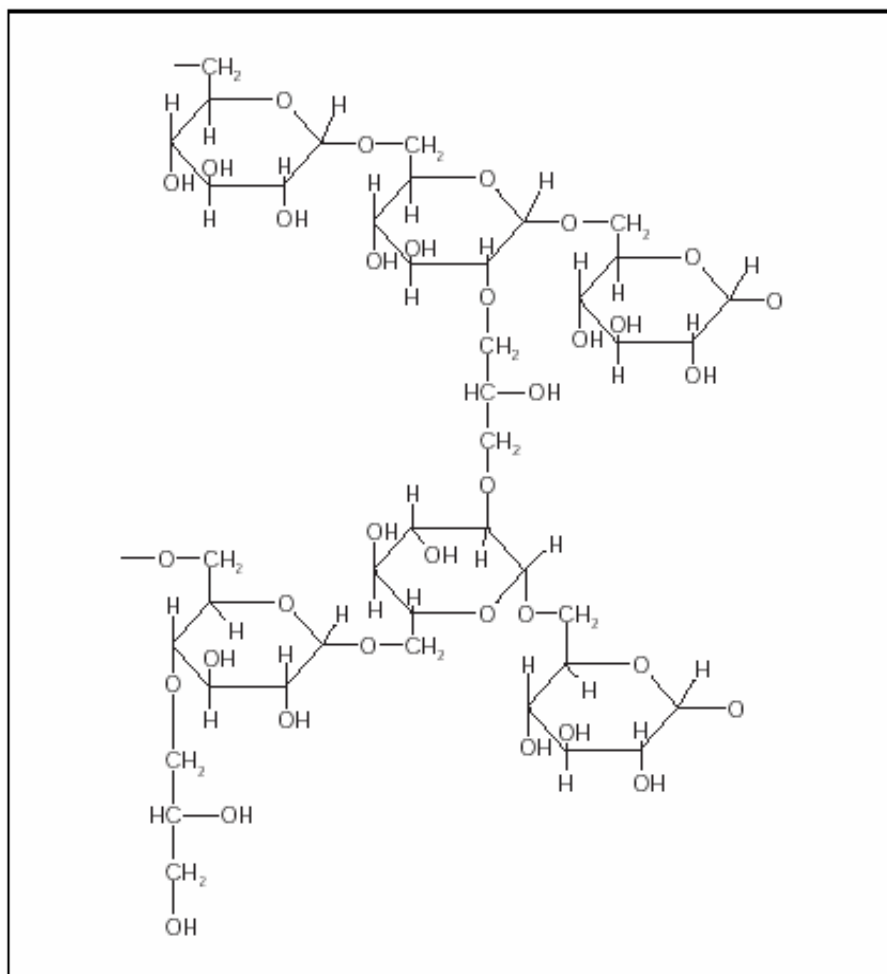
Il principio generale è che maggiore è il grado di reticolazione, maggiore è la stabilità meccanica.

I gel ad alto grado di reticolazione in questo contesto, sono anche definiti gel "rigidi". Tali gel rigidi sono, comunque, meno stabili meccanicamente di quelli "semi-rigidi". Il gruppo dei gel "semi-rigidi" comprende fondamentalmente polimeri vinilici e stirene-divinile. I gel "duri", d'altro canto, sono disponibili in fasi che vanno dal vetro poroso al gel di silice. A seconda del tipo di gel, si fa anche una distinzione fra gel idrofilici (per GFC) e gel lipofilici (per GPC).

Esempio di un gel al destrano: Sephadex

Il Sephadex è un gel a bolle che è prodotto per reticolazione del destrano con l'epicloridrina ed ha la seguente struttura:

Figura 11:
Struttura del Sephadex
(per gentile concessione
di [1] Pharmacia AG
Svezia)



Nella tabella sottostante sono elencati un certo numero di gel per GFC e GPC. I dati contenuti in tale tabella sono tratti da dati di letteratura ed i gel non sono elencati in ordine di importanza.

Tabella 1:
Raccolta di vari gel
per GFC e GPC preparativa

Supplier	Designation	Type of gel	Fractionating range (MW)	Method
Pharmacia	Sephadex G	Dextran	up to 2.5×10^5	GFC
	Sephadex LH	Dextran	up to 2.5×10^5	GPC
	Sephacryl	Cross-linked Dextran	up to 10^6	GFC
	Sepharose	Agarose	up to 20×10^5	GFC
Merck	Fraktogel TSK	Vinyl-Polymer	up to 50×10^5	GFC/GPC
	LiChrospher	Silica gel	up to 10×10^6	GFC/GPC
Bio-Rad	Bio-Gel A	Agarose	up to 10^9	GFC
	Bio-Gel P	Polyacrylamid	up to 4×10^5	GFC
LKB	LKB-AcA-Ultrigel	Polyacrylamid Agarose	up to 10^6	GFC
Serva	Daltosil	Silica gel	up to 10^9	GFC/GPC

Come già menzionato, il grado di reticolazione o la dimensione dei pori, rispettivamente, determinano l'intervallo di frazionamento di un gel. Questo significa che il gel adatto deve essere selezionato con cura per ogni diversa separazione. I dati più importanti vengono generalmente forniti nella documentazione delle ditte produttrici.

Come esempio, la tabella 2 mostra la gamma di frazionamento dei diversi tipi di Sephadex G.

Tabella 2:
Intervalli di frazionamento per
Sephadex da G-10 a G-200.
G-10 e G-50 sono gel rigidi.

Type	Fractionating range		Bed volume ml/g dry gel
	MW Proteins	MW Dextrans	
G-10	- 700	- 700	2 - 3
G-15	- 1500	- 1500	2.5 - 3.5
G-25	1000 - 5000	100 - 5000	4 - 6
G-50	1500 - 30000	500 - 10000	9 - 11
G-75	3000 - 80000	1000 - 50000	12 - 15
G-100	4000 - 150000	1000 - 100000	15 - 20
G-150	5000 - 300000	1000 - 150000	20 - 30
G-200	5000 - 600000	1000 - 200000	30 - 40

4. Fase Mobile

4.1 Generalità

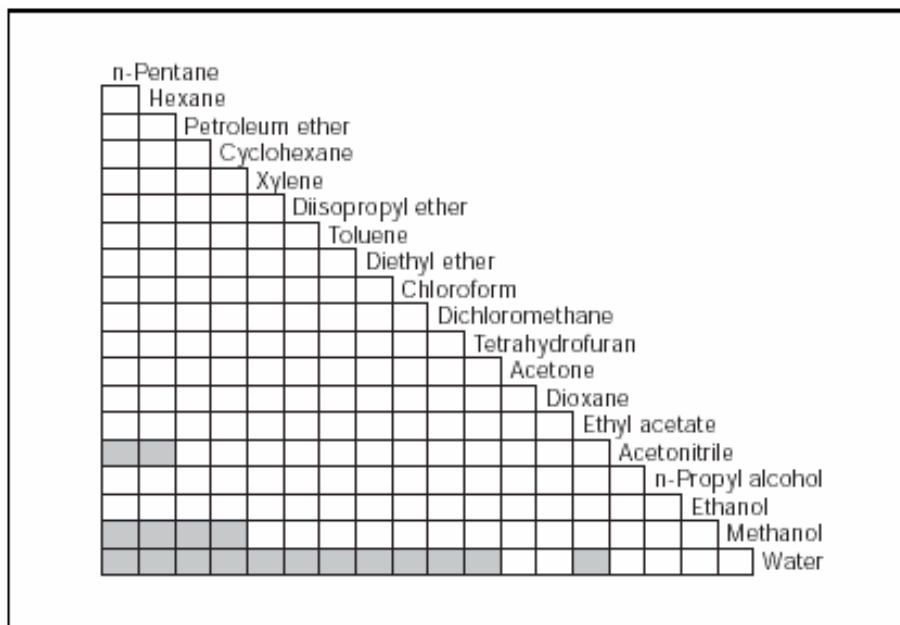
La fase mobile è il parametro più facilmente variato quando si ottimizza un sistema cromatografico. Nel valutare le fasi mobili, lo scopo è quello di trovare il solvente, o la miscela di solventi, più adatti per mezzo di una procedura sistematica, usando allo stesso tempo meno materiale possibile e nel minore tempo possibile. In questo processo, considerazioni di tipo pratico ed economico sono tanto importanti quanto la capacità di ottenere una separazione efficace.

Non si è mai enfatizzato abbastanza come la caratteristica più importante della fase mobile sia la sua caratteristica di solubilizzare completamente il campione.

Se la separazione dovesse essere controllata tramite un detector UV, il solvente usato dovrebbe essere trasparente all'UV e non assorbire luce UV alla lunghezza d'onda usata dal detector.

La fase mobile molto spesso consiste di una miscela di solventi e quindi richiede che tali solventi siano miscibili. Una tabella di miscibilità fra i vari solventi è mostrata in figura 12.

Figura 12:
Miscibilità tra solventi



Il punto di ebollizione dei solventi scelti è di grande importanza per quanto riguarda il recupero del campione e dei solventi. Un basso punto di ebollizione assicura una procedura di recupero facile, non aggressiva ed economica. Comunque, i solventi usati non dovrebbero avere un punto di ebollizione troppo basso ($T_b < 40^\circ\text{C}$), altrimenti potrebbero evaporare già durante la separazione con il contemporaneo aumento della temperatura dovuto alla solvatazione della silice.

Si dovrebbero inoltre preferire solventi a bassa viscosità per minimizzare i problemi di "contropressione" della colonna.

Si dovrebbero poi considerare la stabilità e l'inerzia chimica in maniera da evitare la contaminazione o modificazione del campione. Sono inoltre da evitare gli agenti stabilizzanti. Un basso tenore di tossicità, infiammabilità e costo completano le caratteristiche ideali della fase mobile.

4.2 Forza del Solvente e Selettività

Nella cromatografia di adsorbimento, la polarità della fase mobile, ovvero del solvente, determina i tempi di eluizione.

Nel caso di un alcano, per esempio, questo valore è debole, mentre nel caso del metanolo questo è molto pronunciato. In questo senso, i solventi sono stati descritti come forti o deboli. Invece della polarità (scala di Hildebrand), Snyder ha infatti introdotto la forza del solvente S_1 , basata su valori determinati sperimentalmente. La forza di una fase mobile può essere diminuita aggiungendo un solvente con minore forza del solvente.

I dati corrispondenti sono riassunti nella tabella 3.

Tabella 3:
Forza del solvente

Solvent	Solvent strength S_1	Selectivity group
n-Pentane	0.0	-
Hexane	0.1	-
Petroleum ether	0.2	-
Cyclohexane	-0.2	-
Carbon tetrachloride	1.6	-
Butyl chloride	-0.2	VI
Xylene	2.5	VII
Isopropyl ether	2.4	II
Isopropyl chloride	1.2	VI
Toluene	2.4	VII
Benzene	2.7	VII
Diethyl ether	2.8	I
Chloroform	4.1	VIII
Dichloromethane	3.1	V
Tetrahydrofuran	4.0	III
1,2-Dichloroethane	3.5	V
Methyl ethyl ketone	4.7	VI
Acetone	5.1	VI
Dioxane	4.8	VI
Ethyl acetate	4.4	VI
Triethylamine	1.9	I
Nitromethane	6.0	VII
Acetonitrile	5.8	VI
Pyridine	5.3	III
Propanol	3.9	II
Ethanol	4.3	II
Methanol	5.1	II
Water	10.2	VIII

A parte la polarità, comunque, ci sono altri fattori che influenzano l'adattabilità dei un solvente per un particolare problema di separazione.

Un aiuto semplice e valido in questo senso è il triangolo di selettività definito da Snyder. Il triangolo di selettività permette ai solventi con specificità molto simile di essere classificati in sottogruppi a seconda dei parametri di "dipolo", "donatore di protoni" e "accettore di protoni".

Questo triangolo di selettività rende possibile comparare solventi con selettività differenti virtualmente a colpo d'occhio. Soprattutto nel caso di miscele sconosciute, è importante paragonare il potere separativo di solventi appartenenti a diversi gruppi di selettività.

Figura 13:
Triangolo di selettività

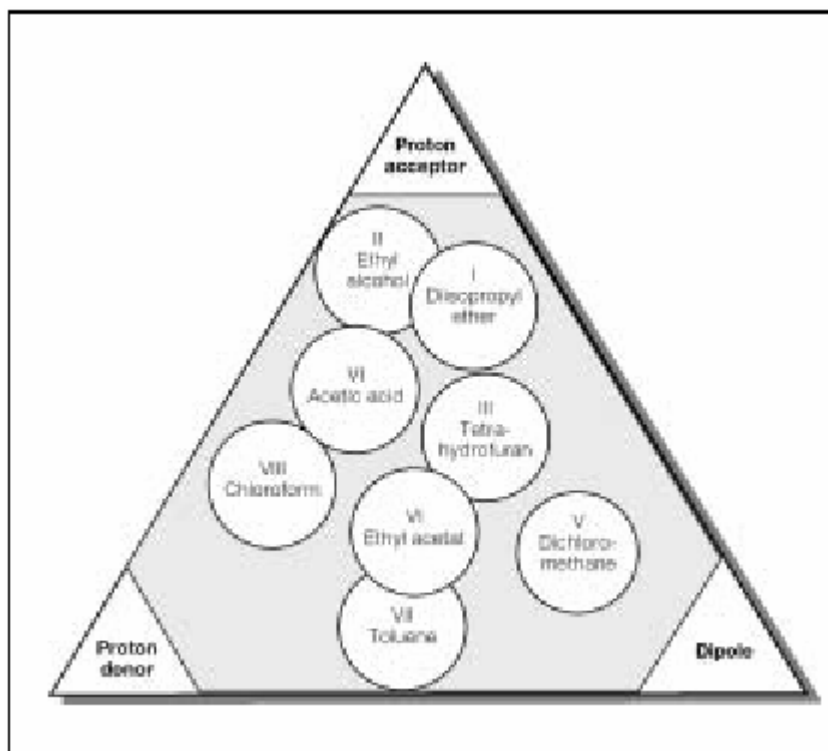


Tabella 4:
Gruppi di selettività
con esempi

Solvent	Group	Strength S_1	UV limit
n-Hexane	-	0.1	200
Cyclohexane	-	0.2	210
Diisopropyl ether	I	2.4	220
Diethyl ether	I	2.8	220
Ethanol	II	4.3	200
Methanol	II	5.1	200
Tetrahydrofuran	III	4.0	220
Acetic acid	IV	6.0	
Dichloromethane	V	3.1	250
Ethyl acetate	VI	4.4	260
Aceton	VI	5.1	330
Acetonitrile	VI	5.8	210
Toluene	VII	2.4	290
Xylene	VII	2.5	290
Chloroform	VIII	4.1	250

La procedura sistematica raccomandata per identificare una fase mobile adatta è descritta nella sezione 9.3.

Riassumendo, si può affermare che la polarità determina il tempo di eluizione, laddove gli altri parametri determinano la selettività di un solvente. Altre caratteristiche vantaggiose sono la bassa viscosità ed un basso punto di ebollizione che determinano una bassa "retropressione" ed una certa facilità di recupero del solvente, rispettivamente. Bassa tossicità, basso costo, purezza, stabilità chimica e inerzia sono altri fattori che influenzano la scelta del solvente.

4.3 Purezza

I problemi di purezza sono direttamente correlati ai costi. Nessun solvente è puro al 100%. L'impurezza più comune in molti solventi organici è l'acqua. In aggiunta, a seconda dell'origine e della stabilità chimica, questi possono anche contenere anche diversi altri tipi di impurezze. Questi contaminanti, sebbene siano presenti in quantità piccolissime, possono avere un effetto sostanziale sulle separazioni cromatografiche e possono influenzare, per esempio, il rilevamento per assorbimento UV e per indice di rifrazione (per esempio le olefine), cambi nei fattori di capacità k' (per esempio isomeri C_5 e C_6 con composti molto non-polari separati su silice o allumina) o la ritenzione per deattivazione della fase stazionaria e per alterazione delle fasi di ripartizione (per esempio l'acqua).

4.4 Solventi per Cromatografia a Fase Normale

In cromatografia di adsorbimento, la forza di una fase mobile, cioè del solvente, determina il tempo di eluizione. La forza del solvente è la proprietà di spostare una sostanza dai siti attivi della fase stazionaria. Nel caso di un alcano, per esempio, questa proprietà è molto debole, mentre nel caso del metanolo è molto pronunciata. In questo senso, i solventi vengono descritti come forti o deboli. Se i solventi vengono ordinati in ordine crescente di forza, si ottiene quella che viene chiamata una serie eluotropa.

A parte la forza, comunque, ci sono altri fattori che influenzano l'adattabilità di un solvente ad un particolare problema di separazione. Tali proprietà specifiche sono il parametro dipolo, il parametro donatore di protone ed il parametro accettore di protone. Riassumendo, si può dire dunque che la forza del solvente determina il tempo di eluizione, mentre gli altri parametri elencati determinano la selettività di un solvente. Bisogna tener conto di tali circostanze quando si sceglie la fase mobile e/o la sua composizione. Solo una singola fase mobile con la forza e la selettività adatte al particolare problema di separazione porta al successo desiderato. La tabella sotto passa in rassegna i solventi più comunemente usati.

La forza dei solventi è applicata al gel di silice, ma i valori per l'allumina sono virtualmente identici.

Solvent	Solvent strength S_1	Dipole parameter	Proton acceptor parameter	Proton donor parameter	Refractive index	UV limit nm
n-Pentane	0.00	0	0	0	1.358	210
Hexane	0.00	0	0	0	1.357	210
Isooctane	0.01	0	0	0	1.404	210
Petroleum ether	0.01	0	0	0	-	210
Cyclohexane	0.04	0	0	0	1.427	210
Xylene	0.26	0	0.5	0	1.500	290
Diisopropyl ether	0.28	0.5	0.5	0	1.368	220
Toluene	0.29	0	0.5	0	1.496	285
Diethyl ether	0.38	2	2	0	1.353	220
Chloroform	0.40	3	0.5	3	1.443	245
Dichloromethane	0.42	5.5	0.5	0	1.424	245
Tetrahydrofuran	0.45	4	3	0	1.408	220
Acetone	0.56	5	2.5	0	1.359	330
Dioxane	0.56	4	3	0	1.422	220
Ethyl acetate	0.58	3	2	0	1.370	260
Acetonitrile	0.65	8	2.5	0	1.344	200
Propanol	0.82	2.5	4	4	1.380	210
Ethanol	0.88	4	5	5	1.361	210
Methanol	0.95	5	7.5	7.5	1.329	210
Water	large	large	large	large	1.333	190

*Tabella 5:
Serie eluotropica
per la
cromatografia su
fase normale*

Frequentemente, un esperimento preliminare condotto per cromatografia su strato sottile fornisce informazioni utili nella scelta della fase mobile.

Comunque, questo primo studio non ha successo in tutti i casi. Quindi, non ci resta che "il balzo in avanti", cioè l'esperimento in colonna.

La deattivazione della colonna avviene virtualmente automaticamente. Comunque, dato che i solventi di questo tipo provenienti da lotti diversi possono avere un diverso contenuto d'acqua, bisogna fare attenzione quando si fanno comparazioni dirette fra tali cromatogrammi; questo fattore può portare a variazioni nei tempi di ritenzione (cioè la quantità di acqua presente come impurezza in un lotto di solvente può disattivare la colonna portando ad risultati scadenti imprevisti).

4.5 Solventi per Cromatografia a Fase Inversa

Come menzionato prima, in cromatografia a fase inversa tutto avviene nel senso opposto rispetto alla normale cromatografia di adsorbimento. Questo si applica anche alla fase mobile. L'acqua diventa l'eluente più debole, ed il parametro della forza del solvente aumenta al decrescere della polarità.

Nella cromatografia a fase inversa, le fasi mobili usate generalmente sono miscele di acqua e di un secondo solvente miscibile con l'acqua.

I solventi più comunemente usati sono miscele acqua/metanolo e, a causa del parametro donatore di protone decrescente, miscele acqua/acetonitrile. Comunque, dovrebbe essere considerata l'alta tossicità dell'acetonitrile (classe 2 dei veleni, distruzione per riscaldamento di soluzioni acquose diluite con soluzione di idrossido di sodio e perossido di idrogeno). Se in questo caso si traccia una serie eluotropa dei solventi più comunemente usati, si ottiene la seguente tabella:

Tabella 6:
Serie eluotropa
per fase inversa

Solvent	Solvent strength S_1	Dipole parameter	Proton acceptor parameter	Proton donor parameter	Refractive index	UV limit nm
Water	+	large	large	large	1.333	190
Methanol	++	5	7.5	7.5	1.329	210
Acetonitrile	+++	8	2.5	0	1.344	200
Ethanol	++++	4	5	5	1.361	210
Isopropanol	+++++	2.5	4	4	1.380	210
Dioxane	+++++	4	3	0	1.422	220

4.6 Solventi per Cromatografia su Gel

(esclusione dimensionale, scambio ionico, e cromatografia di affinità)

In contrasto con altri tipi di cromatografia, la cromatografia su gel non permette all'utilizzatore di influenzare la separazione variando la fase mobile. La fase mobile si sceglie quindi principalmente in accordo con i tre criteri seguenti:

- buona solubilità della specie
- bassa viscosità (cioè bassa pressione di carico sul gel)
- nessun danno alla fase stazionaria

È molto importante attenersi strettamente ai dati forniti dal produttore del gel, altrimenti si distruggono i gel.

I principali solventi usati in cromatografia sono riassunti nella tabella 12:

Tabella 7:
Solventi usati più
frequentemente in
cromatografia su gel.

Solvent	Boiling point °C	Viscosity mPs	Refractive index n_D^{20}
Acetone	56	0.32	1.359
Benzene	80	0.65	1.501
Chloroform	62	0.58	1.446
Dichloroethane	84	8.84	1.444
Dichloromethane	40	0.30	1.424
N,N-Dimethylformamide	153	0.90	1.428
Dimethyl sulfoxide	189	2.24	1.477
Ethanol	78	1.20	1.361
Methanol	64	0.60	1.329
Tetrahydrofuran	66	0.51	1.407
Toluene	111	0.59	1.496
Water	100	-	1.33

Le sostanze solubili in acqua senza carica possono essere separate per cromatografia su gel in molti casi tramite l'uso di acqua distillata come fase mobile. D'altra parte, le sostanze cariche possono subire interazioni col gel in acqua pura, cosa che è rivelata da una pronunciata coda o da eluizione ritardata (eluizione dopo V_0). In tali casi, la fase mobile deve essere tamponata, allo scopo di controllare il valore di pH e di essere stabilizzata. In molti casi, si usano a tale scopo Tris-HCl o tamponi fosfato. In cromatografia preparativa si è rivelato molto vantaggioso, comunque, usare sostanze tampone che siano volatili nella successiva evaporazione. A tal proposito, l'acetato d'ammonio, ottenuto con una soluzione di acido acetico e di ammoniaca, ha dimostrato di avere un comportamento soddisfacente. Il solvente iniziale per tali tamponi è una soluzione 0.05 M di acetato di ammonio (3.85 g di $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ /litro, pH= 6.6). Il valore di pH desiderato è poi ottenuto aggiungendo una soluzione di acido acetico o ammoniaca e controllando col misuratore di pH.

In aggiunta, si raccomanda di avere una forza ionica nella fase mobile di almeno 0.02 allo scopo di sopprimere ogni interazione fra la sostanza e la fase stazionaria. Se la concentrazione del tampone è insufficiente, la forza ionica richiesta può essere raggiunta usando, per esempio, NaCl o KCl.

La forza ionica si calcola come segue:

Equazione 5
Forza ionica

$$I = \frac{1}{2} \sum_i n_i^2 \cdot c_i$$

I = Ionic strength
n = Charge number of ions
c = Concentration in mol/l

Esempio:

0.01 M NaCl: $I = 0.5 \cdot (1^2 \cdot 0.01) + (1^2 \cdot 0.01) = 0.02$

0.01 M CaCl_2 : $I = 0.5 \cdot (2^2 \cdot 0.01) + (1^2 \cdot 0.01) = 0.03$

La quantità di sale da aggiungere per ottenere la forza ionica richiesta per sali mono-valenti è calcolata come segue:

Equazione 6

$$c = \Delta I$$

I = Ion concentration
c = Quantity of salt in mol/l solvent

5 Deattivatori

Nel gel di silice e nell'allumina, non tutti i siti attivi sono ugualmente attivi; ci sono quelli più attivi e quelli meno. Di conseguenza, una sostanza può essere trattenuta in colonna in modo variabile, con il risultato di uno "scodamento" più o meno pronunciato. Questo fenomeno può essere eliminato aggiungendo un deattivatore alla fase mobile. I deattivatori sono quindi sostanze che saturano i siti più attivi e perciò producono una colonna di attività uniforme.

L'acqua è un buon deattivatore. Comunque, ha anche un effetto molto pronunciato sulla polarità e quindi anche sul parametro della forza del solvente. Per questa ragione, i solventi che contengono più del 50% di acqua sono usati per preparare la fase mobile in HPLC analitica; questo porta ad una standardizzazione del solvente.

In cromatografia preparativa, ciò non è generalmente possibile, poiché come regola non si usano solventi particolarmente puri (purezza per HPLC). Comunque, i solventi meno puri contengono quantità maggiori o minori di acqua, così che, in pratica, la deattivazione avviene automaticamente.

I deattivatori possono giocare un ruolo importante nelle separazioni cromatografiche e possono addirittura essere il fattore chiave, in certi casi. Comunque, per le purificazioni su scala preparativa, le grandi quantità ed il più basso grado di purezza dei solventi usati spesso rendono difficile mantenere una concentrazione costante di deattivatore. Uno stretto controllo di questo parametro per la cromatografia su larga scala porta però ad un drastico aumento dei costi.

6 Rilevamento

Quando si effettua la separazione cromatografica, è necessario sapere il più esattamente possibile quando un prodotto è fluìto dalla colonna. Solo in questo modo si può ottenere un frazionamento ideale. In HPLC analitico, vari rilevatori sono usati per questo scopo. In cromatografia preparativa, sono usati principalmente due tipi di rilevatori, ovvero il rilevatore UV e quello basato sull'indice di rifrazione.

I rilevatori impiegati nella cromatografia preparativa liquida dovrebbero essere in grado di adattarsi ai grossi flussi che sono raggiunti nel processo. Questo tipo di problema deve essere considerato perché alcuni solventi saturano la lettura dell'assorbanza UV dei rilevatori a causa del loro ampio spettro di assorbimento nel range dell'UV. Per cui, una certa fase mobile potrebbe essere appropriata per le TLC ma compromettere il rilevamento UV in colonna.

Dovrebbe anche essere ricordato che il rilevamento per trattamento con rivelatori chimici (come ninidrina, anisaldeide, permanganato) NON è possibile in colonna (diversamente dalla TLC, dove tale metodo è usato per sostanze che non assorbono in UV).

Si ricorre spesso ad una combinazione di diversi strumenti per il rilevamento (per esempio detectors UV e RI) per ottenere un controllo migliore del processo di separazione.

6.1 Rilevatore UV

I rilevatori UV sono quelli più comunemente usati in cromatografia preparativa. Il rilevatore UV è un rilevatore selettivo, in altre parole, misura solo sostanze che assorbono luce di una lunghezza d'onda selezionata nell'intervallo ultravioletto (UV-attivo). È questo che fa nascere tutti i problemi legati a questo metodo di determinazione.

Le sostanze UV attive sono:

- Sostanze con un anello aromatico
- Sostanze con almeno due doppi legami coniugati
- Sostanze con un doppio legame adiacente ad un atomo con doppietti elettronici solitari
- Sostanze con gruppi carbonilici
- Sostanze contenenti bromo, iodio o zolfo

Il rilevatore UV misura l'assorbimento del raggio di luce UV che passa attraverso una soluzione. L'assorbimento della luce si riferisce alla concentrazione della soluzione attraverso la quale il raggio di luce sta passando. Questa relazione è descritta dalla legge di Lambert-Beer:

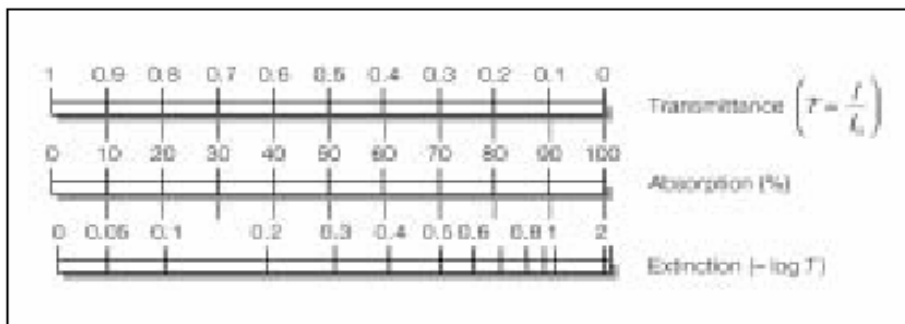
Equazione 7
Legge di Lambert-Beer

$$E = \epsilon \cdot c \cdot d$$

E = Extinction [dimensionless]
 ϵ = Extinction coefficient [$M^{-1} \cdot cm^{-1}$]
c = Solution concentration [mol/l]
d = Path length of the light beam through the solution [cm]

L'estinzione E è il logaritmo negativo della trasmittanza. La relazione fra la trasmittanza e l'estinzione è mostrata nella figura sottostante.

Figura 14:
Relazione tra trasmittanza,
assorbimento ed estinzione.



L'intervallo di concentrazione per misurare l'assorbimento nelle applicazioni pratiche è limitato. Questo è il problema principale quando si usano i rilevatori UV nella cromatografia preparativa; le concentrazioni misurate sono così alte che si eccede di gran lunga l'intervallo di misurazione. Le seguenti possibilità possono porre rimedio a tale limitazione:

- Misurare l'assorbimento ad una lunghezza d'onda diversa (lontana dal massimo del picco, verso il limite del picco). Questa è una possibilità che esiste, comunque, solo per rilevatori a lunghezza variabile. I rilevatori a lunghezza d'onda fissa (filtri) normalmente misurano a 254 nm o a 280 nm.
- Usare una cella con una lunghezza del cammino minore

Come regola generale, il rilevatore all'UV si può usare senza nessun problema in cromatografia su gel, dato che le normali celle per la misurazione sono in grado di adattarsi ai bassi flussi in uso.

6.2 Rilevatore all'indice di rifrazione

Il rilevatore all'indice di rifrazione misura le variazioni nella rifrazione della luce che viene causata da un mezzo quando questa passa attraverso la cella di misurazione. È quindi non selettivo; in altre parole registra tutte le sostanze che passano attraverso la cella. I rilevatori all'indice di rifrazione sono meno sensibili di quelli all'UV (fino ad approssimativamente un fattore di 1000). Comunque, generalmente questo non è uno svantaggio in cromatografia preparativa, ma anzi è un vantaggio!

Per una minima sensibilità con i rilevatori RI su scala preparativa, dovrebbe essere scelto un solvente con RI simile a quella del composto in maggior concentrazione.

Il rilevatore all'indice di rifrazione misura sulla base del seguente principio:

Equazione 8:
Principio dell'indice di rifrazione

$$\Delta n = n_G - n_L \approx (n_1 - n_2) \cdot c$$

n = Difference between the refractive indices
 n_G = Refractive index of the dissolved sample
 n_L = Refractive index of the pure solvent
 n_1 = Refractive index of the sample
 c = Concentration of the sample

Poiché il rilevatore all'indice di rifrazione non è specifico, è perciò universalmente applicabile. Per l'eluizione a gradiente, comunque, il rilevatore all'indice di rifrazione non è adatto, o meglio è adatto solo in certe condizioni, poiché l'eluato viene sempre comparato con il solvente puro in una cella di riferimento. Il sistema è perciò sensibile ai cambi di composizione nella fase mobile.

È molto importante che l'intervallo di flusso di quel particolare rilevatore sia noto e ben controllato. Se il flusso scende sotto il livello minimo, il cromatogramma "balla" e diventa difficile da interpretare. Se, d'altra parte, si supera il flusso massimo, la cella di misurazione può esplodere. In molti casi, una combinazione di rilevatori UV ed RI può fornire importanti informazioni aggiuntive.

6.3 Rilevatore a conduttività

Quando si separano sostanze cariche (per esempio ioni o proteine), le variazioni nella composizione e concentrazione dell'eluente sono legate a variazioni di conduttività che possono essere usate per monitorare l'eluizione cromatografica.

Specie ioniche diverse hanno una diversa conduttività specifica.

Per elettroliti forti totalmente dissociati e dissolti, la conduttività è calcolata come segue:

Equazione 9:
Conduttività

$$\kappa = N \cdot e \cdot z (u_+ + u_-) \cdot c$$

N = Number of transported ions
 e = Elementary charge
 z = Ion charge
 u₊ and u₋ = Ion mobility
 c = Ion concentration (c = c₊ = c₋ assumed)

Un'altra formula che si deriva dalla precedente equazione e più semplice da maneggiare nasce dalla normalizzazione della concentrazione:

Equazione 10:
Conduttività normalizzata

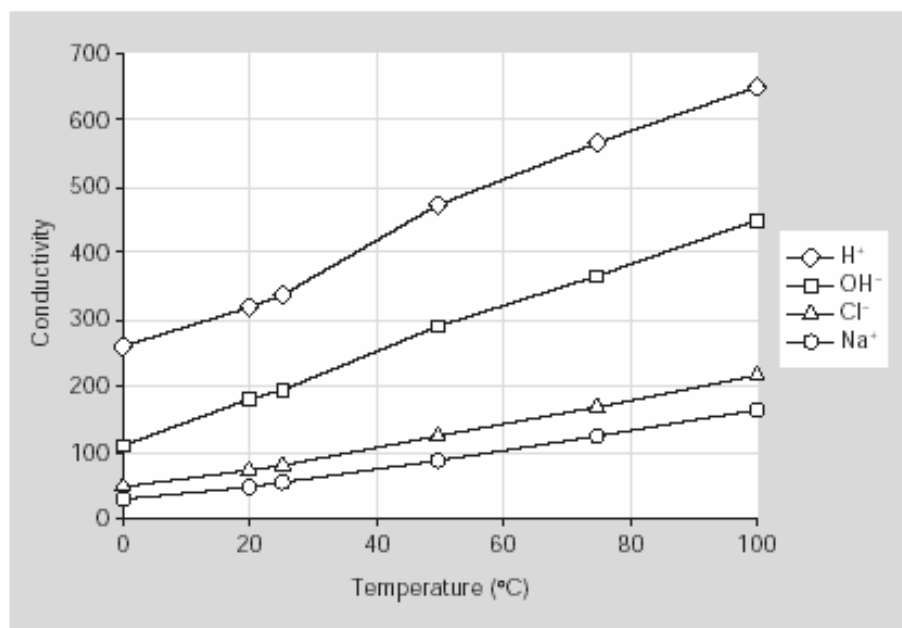
$$\Lambda_m = n_+ \cdot \lambda_+ + n_- \cdot \lambda_-$$

n₊ and n₋ = Number of ions in a formula unit
 λ₊ and λ₋ = Limiting ionic conductivities (see table 8)

Cation	λ (S cm ² mol ⁻¹)	Anion	λ (S cm ² mol ⁻¹)
H ⁺	349.8	OH ⁻	197.6
Li ⁺	38.7	F ⁻	55.0
Na ⁺	50.1	Cl ⁻	76.3
K ⁺	73.5	Br ⁻	78.3
Rb ⁺	77.0	I ⁻	76.8
Cs ⁺	77.7	ClO ₃ ⁻	65.3
Ag ⁺	61.9	ClO ₄ ⁻	67.3
Mg ²⁺	53.1	NO ₃ ⁻	71.4
Ca ²⁺	59.5	SO ₄ ²⁻	80.0
Ba ²⁺	63.6	CH ₃ COO ⁻	40.9

Si dovrebbe comunque notare che la conduttività molare è fortemente dipendente dalla temperatura. Dunque, la sua misurazione richiede la possibilità di mantenere una temperatura costante.

Figura 15:
Dipendenza dalla temperatura
della conduttività ionica λ



7 Caratterizzare una colonna

Per varie ragioni, è necessario accertarsi di determinate caratteristiche di una colonna e questo particolarmente nel caso che la colonna sia impaccata dall'utente stesso. Esse sono usate, per esempio, per tenere sotto controllo l'impaccamento delle colonne, permettendo di eliminare immediatamente le colonne impaccate male. Comunque, tali caratteristiche sono anche indispensabili quando si vogliono comparare diversi metodi di impaccamento o diversi adsorbenti. Quali caratteristiche dovrebbero essere usate per questo scopo? Quali dati permettono di eseguire una comparazione in maniera più obiettiva possibile?

La letteratura descrive vari metodi per caratterizzare le colonne HPLC analitiche. Per esempio, Bristol e Knox propongono un metodo standardizzato con un test che permette la comparazione di colonne fra diversi laboratori. Sebbene tale metodo, in principio, possa essere usato per le colonne preparative, tutto il calcolo è in qualche modo complicato a tal punto che, nel loro lavoro, è stato descritto un appropriato programma per computer in BASIC. In un laboratorio preparativo, comunque, in genere si desidera ottenere poche informazioni basilari circa la qualità di una colonna auto-impaccata con poco sforzo e in generale solo per scopi di comparazione interna. Poiché in molti casi si utilizza sempre lo stesso adsorbente, una appropriata caratterizzazione della colonna si può eseguire in modo semplice.

Quale informazione è importante per valutare una colonna preparativa? Sono importanti soprattutto due fattori, nello specifico:

- a) le informazioni circa le proprietà della colonna legate al flusso, che permettono principalmente di valutare la qualità dell'impaccamento della colonna, e
- b) le informazioni sull'efficienza della colonna. Queste informazioni permettono di trarre conclusioni sulla qualità della separazione cromatografica che si potrà ottenere.

7.1 Il cromatogramma

Se l'uscita della colonna è controllata con un rilevatore appropriato durante la separazione cromatografica, ed il segnale prodotto da tale rilevatore viene registrato come concentrazione messa in grafico contro il tempo, si ottiene una curva caratteristica. Se ci si riferisce al segnale di un rilevatore messo in grafico in questo modo come ad un picco e, nel caso ideale, questo costituisce una curva Gaussiana, tutta la registrazione di tutti i segnali dei rilevatori si chiama cromatogramma.

I seguenti dati possono essere ottenuti direttamente da tale cromatogramma:

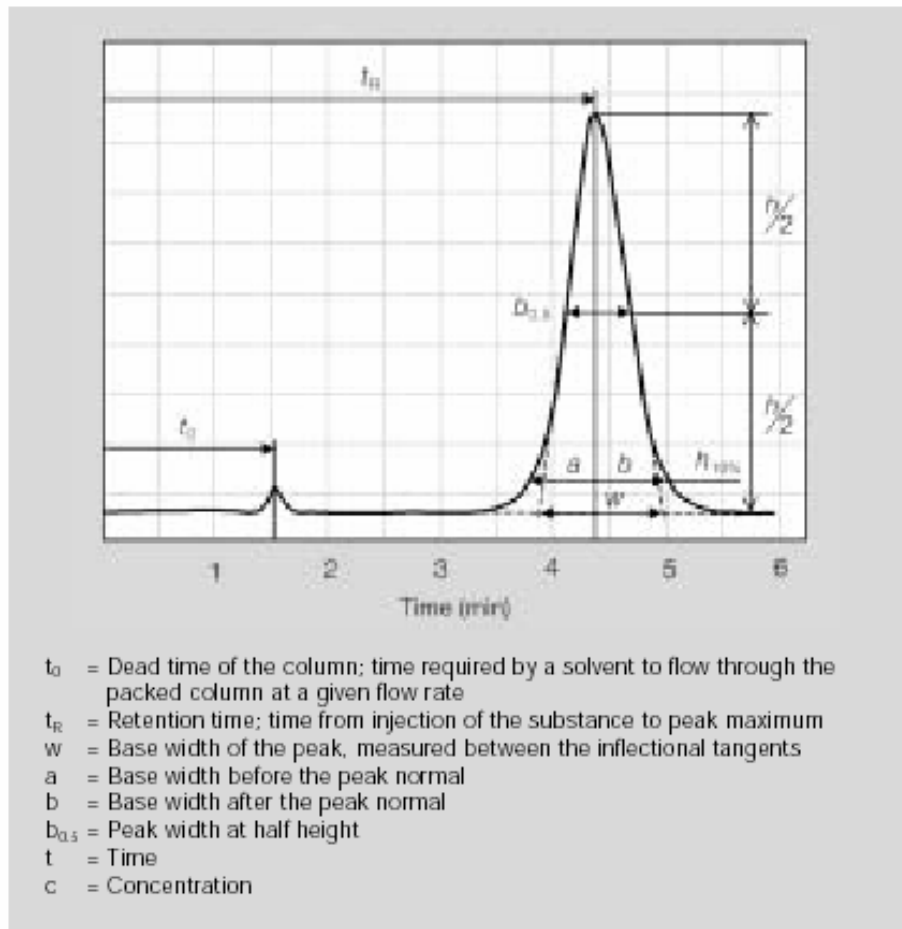


Figura 16: Parametri misurabili di un cromatogramma

Non sarebbe molto sensato caratterizzare una colonna, per esempio, riportando il tempo di ritenzione o l'ampiezza del picco, anche se fossero usate le stesse sostanze per il test. Questi parametri dipendono da troppi fattori, come il flusso, la composizione dell'eluente, la lunghezza della colonna, ecc. Comunque, una valutazione della colonna che è generalmente appropriata per la cromatografia preparativa è quella basata sull'indice di simmetria e sul numero di piatti teorici e sull'altezza dei piatti.

7.2 L'indice di simmetria

L'indice di simmetria (S.I.) descrive approssimativamente la forma del picco ed è quindi un parametro utile per valutare le proprietà di flusso della colonna. È definito come:

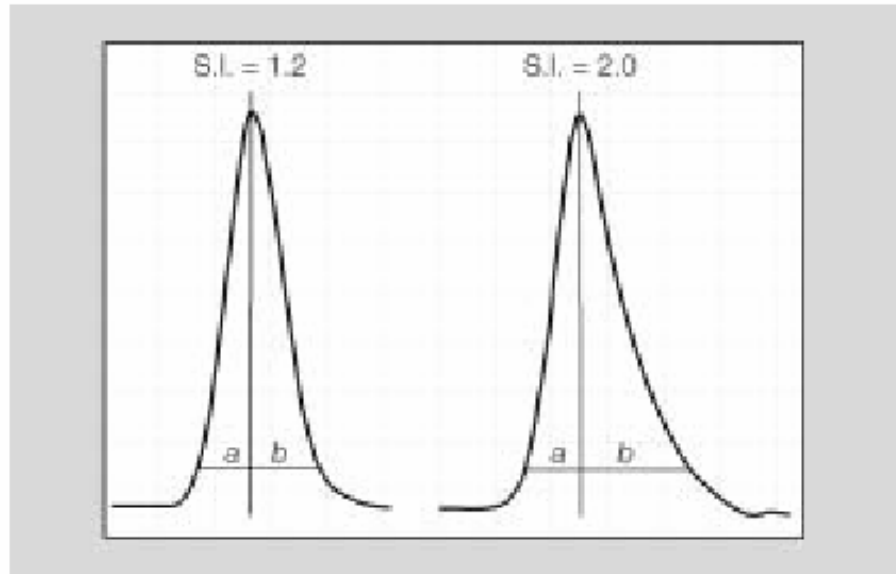
Equazione 11

$$SI = \frac{b}{a}$$

Le irregolarità nell'impaccamento delle colonne diventano immediatamente apparenti per il fatto che si ottengono picchi con una profonda asimmetria. Comunque, una preconditione per questo tipo di test è che si usi una sostanza test con il migliore comportamento di eluizione possibile. La figura 17 mostra un cromatogramma ottenuto con una colonna male impaccata, registrato in condizioni identiche.

Figura 17:

Esempio di picchi con buon (a destra) e cattivo (a sinistra) indice di simmetria (per semplicità l'indice di simmetria è misurato non alla base del picco ma al 5-10% dell'altezza del picco, nell'esempio specifico è al 5%).



Più è simmetrico il picco, migliore è l'impaccamento della colonna (S.I. vicino ad 1).

7.3 Numero di piatti teorici

Un altro parametro di paragone è il numero di piatti teorici, N, di una colonna, che può essere calcolato usando la seguente formula:

Equazione 12:
Numero di piatti teorici.

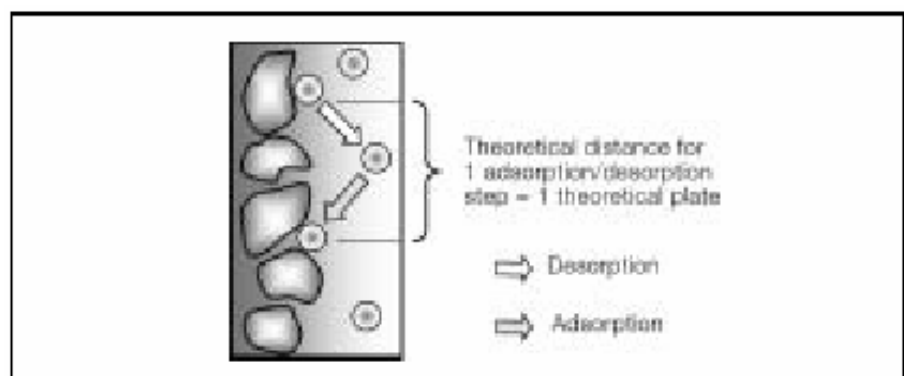
$$N = 5.54 \cdot \left(\frac{t_R}{b_{0.5}} \right)^2 = 16 \cdot \left(\frac{t_R}{w} \right)^2$$

Questa formula è basata sull'assunzione che il picco abbia una forma Gaussiana. Generalmente, per semplificare i calcoli matematici della teoria cromatografica, si assume che i picchi abbiano forma Gaussiana.

Un valore di N grande corrisponde ad una buona colonna, laddove un valore piccolo indica una cattiva colonna.

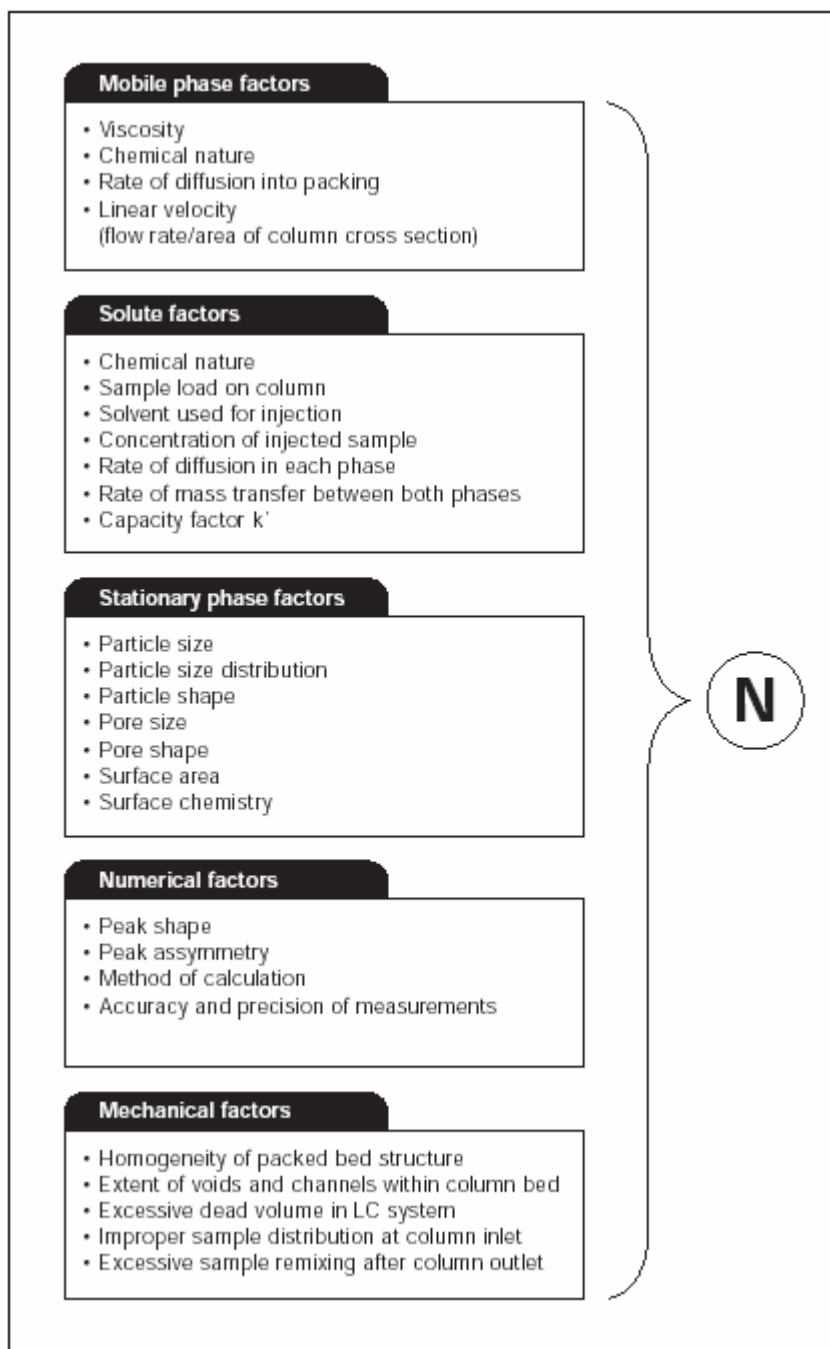
Il concetto di "numero di piatti teorici" nacque mentre si cercava un indicatore universale delle proprietà per le colonne cromatografiche, che idealmente doveva essere adimensionale, indipendente dalla scala e facilmente misurabile. Corrisponde al numero di equilibri teorici di una sostanza fra le fasi stazionaria e mobile attraverso la colonna, e può essere rappresentato dalla distanza teorica richiesta per uno step adsorbimento-desorbimento:

Figura 18:
Numero di piatti teorici



Il numero di piatti teorici di una colonna dipende principalmente dalle dimensioni delle particelle dell'adsorbente, il flusso lineare del solvente e la lunghezza della colonna.

Figura 19:
Fattori che influenzano
il numero di piatti teorici



7.4 Altezza equivalente ad un piatto teorico

Allo scopo di essere in grado di comparare fra loro colonne di lunghezza diversa, è consigliabile calcolare l'altezza del piatto H (altezza equivalente ad un piatto teorico) invece del numero di piatti N.

Equazione 13:
Altezza equivalente
di un piatto teorico.

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

L = Column length in mm
N = Number of theoretical plates

7.5 Altezza ridotta di un piatto

Per comparare colonne con adsorbenti con particelle di dimensione diversa, il parametro più adatto è l'altezza ridotta di un piatto, h.

Equazione 14:
Altezza ridotta di un piatto

$$h = \frac{H}{dp}$$

dp = Particle diameter of the adsorbent
H = Height equivalent of a theoretical plate

Poiché, in alcuni casi, il numero di piatti teorici è leggermente dipendente dalla sostanza test, devono essere date informazioni precise sulla sostanza usata nei test e sulle condizioni del test.

Più stretto è il picco per un dato tempo di ritenzione, maggiore è l'efficienza della colonna.

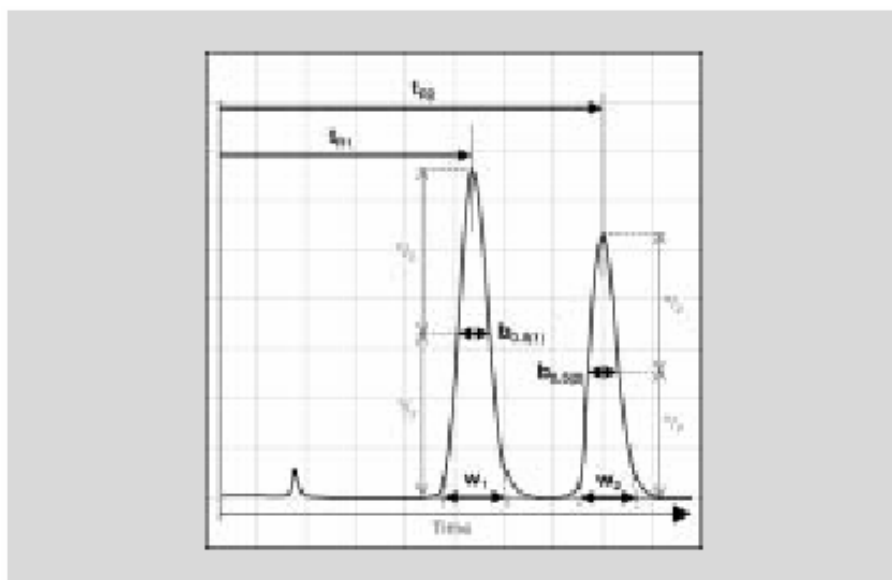
7.6 Risoluzione

In aggiunta all'indice di simmetria e al numero di piatti teorici, è possibile calcolare un'ulteriore caratteristica, la risoluzione, R, valutando la colonna con una miscela di riferimento. La risoluzione si riferisce alle posizioni relative di due picchi adiacenti. Poiché anche in questo caso fattori specifici del materiale e fattori correlati all'apparecchiatura hanno un ruolo importante, devono sempre essere date le condizioni precise del test e la definizione esatta dell'adsorbente. La risoluzione R è calcolata come:

Equazione 15:
Risoluzione

$$R = \frac{2 \cdot (t_{R2} - t_{R1})}{w_1 + w_2} = \frac{1.177 \cdot (t_{R2} - t_{R1})}{b_{0.5(1)} + b_{0.5(2)}}$$

Figura 20:
Dati necessari per il calcolo della risoluzione.



La risoluzione R è quindi una delle caratteristiche specifiche. È adatta allo scopo della comparazione quando solo un adsorbente ed una ben definita miscela dei riferimenti sono usate in laboratorio.

Un rapporto ottimale tempo/benefici si ottiene con una risoluzione $R = 1.0$.

7.7 Volume morto

Il volume morto V_0 è definito come lo spazio vuoto in una colonna impaccata. Consiste nel volume intergranulare e nel volume dei pori.

In principio, conoscendo la velocità di uscita F_m ed il corrispondente tempo di ritenzione t_R di una sostanza non adsorbita, il volume morto di una colonna può essere determinato come segue:

Equazione 16:
Volume morto

$$V_0 = t_R \cdot F_m$$

G. Helmchen e B. Glatz (4) hanno descritto un metodo semplice che può essere raccomandato e si suppone che faccia superare le difficoltà. In questo metodo, la colonna è completamente riempita con un solvente (per esempio metanolo), ed è chiusa e pesata (= G_1). La colonna è quindi ricondizionata con un secondo solvente (per esempio diclorometano) e pesata di nuovo (= G_2). Il volume è quindi calcolato dalla differenza di peso, come segue:

Equazione 17:
Volume morto calcolato
secondo Helmchen e Gratz

$$V_0 = \frac{G_2 - G_1}{d_2 - d_1} \quad (G_2 > G_1)$$

G_1 = Weight of column, filled with solvent 1
 G_2 = Weight of column, filled with solvent 2
 d_1 = Density of solvent 1
 d_2 = Density of solvent 2

Nelle colonne riempite a secco, questa determinazione può essere eseguita in una maniera ancora più semplice. Si pesa la colonna asciutta (= G_1), si condiziona la colonna col solvente desiderato, si chiude e si pesa di nuovo (= G_2). Il volume morto si calcola come segue:

Equazione 18:
Calcolo di V_0

$$V_0 = \frac{G_2 - G_1}{d}$$

G_1 = Weight of packed dry column
 G_2 = Weight of column, filled with solvent
 d = Density of solvent

Se si conosce il volume morto V_0 , il tempo morto t_0 (chiamato anche tempo di breakthrough) può essere determinato in una semplice maniera come segue:

Equazione 19:
Calcolo del tempo morto

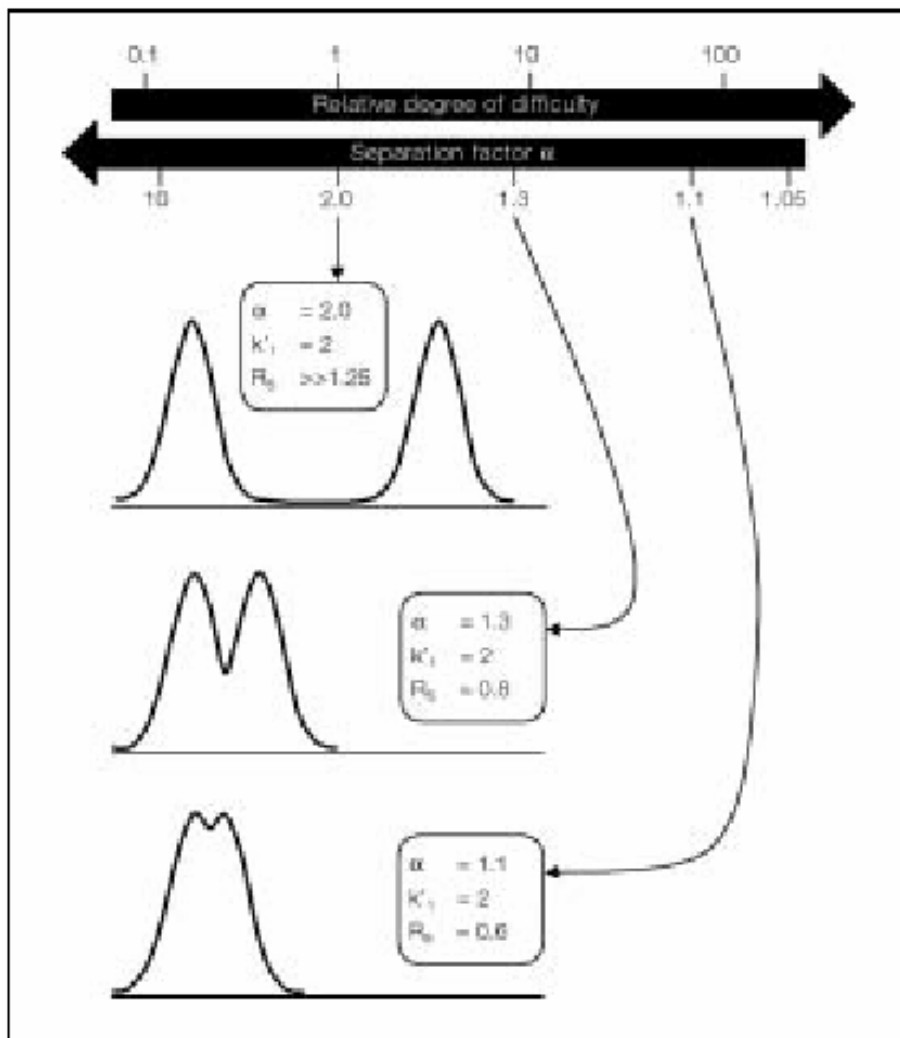
$$t_0 = \frac{V_0}{F_m}$$

V_0 = Dead volume in ml
 F_m = Flow rate in ml/min

8 Fattori che influenzano la separazione cromatografica

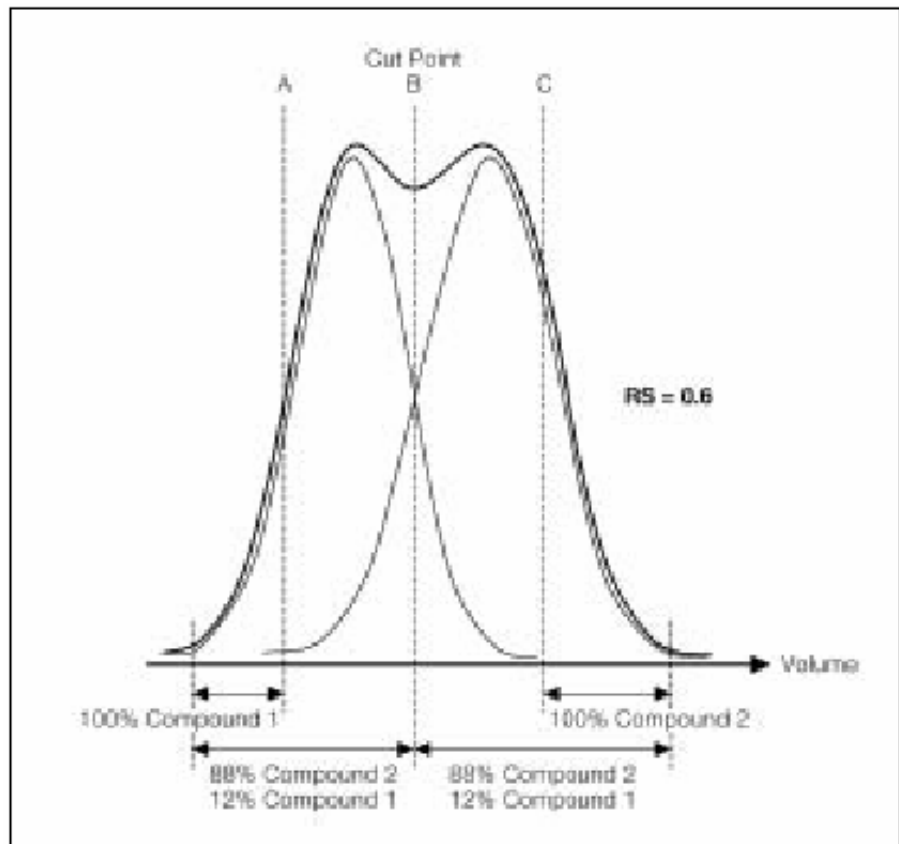
Quando il fattore di separazione diminuisce ed i picchi si avvicinano l'uno con l'altro, la separazione diventa più difficile.

Figura 21:
Relazione tra il fattore di separazione α e la difficoltà della separazione.



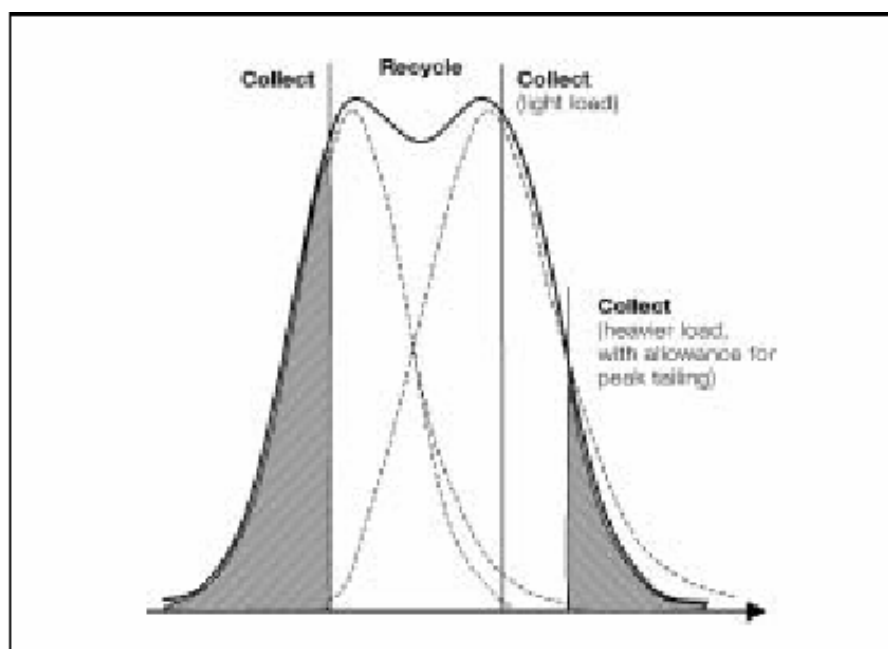
In un caso come quello riportato nella figura 21, sebbene non sia ideale, l'isolamento di materiale puro è ancora possibile con una risoluzione $R = 0.6$, ma richiede un punto di taglio nelle frazioni collezionate. Solo le frazioni ai bordi, rispetto ai picchi, sono raccolte, mentre il resto, ciò che sta in mezzo, può essere riciclato e separato di nuovo. Con una risoluzione crescente, la purezza ai punti di taglio aumenta in maniera drammatica.

Figura 22:
Composti puri con bassa
risoluzione



Le corse con carichi alti tendono a distorcere le forme dei picchi. È quindi saggio collezionare i campioni ad un punto che sia lontano dal punto di taglio C in modo da non collezionare campioni dalla testa o dalla coda dei picchi. Questa procedura di riciclaggio si chiama "rasatura del picco".

Figura 23:
Rasatura del picco



8.1 Fattore di capacità k'

Frequentemente ci si riferisce al fattore di capacità k' come ad un fattore di ritardo. Infatti, sostanzialmente quest'ultimo nome esprime meglio il significato di quanto faccia il temine "fattore di capacità"; Questo infatti è una misura di quanto venga ritardata una sostanza da parte di un adsorbente.

Il fattore di capacità è calcolato come segue:

Equazione 20:
Fattore di capacità k'

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

t_R = Retention time
t₀ = Dead time

Il fattore di capacità è indipendente dalla lunghezza della colonna e dal flusso lineare dell'eluente. Inoltre è proporzionale all'area superficiale specifica dell'adsorbente, e di questo bisogna tenere conto quando si paragonano materiali diversi. Il fattore di capacità può essere direttamente influenzato dalla polarità della fase mobile. Se si lavora con una fase stazionaria polare (gel di silice, allumina), si applica la regola seguente: più è polare la fase mobile, minori sono i valori di k'.

Nel caso di cromatografia a fase inversa, ovviamente, si applica l'inverso. Le polarità di molti solventi comuni sono riassunte in tabella 2.

Tabella 9:
Polarità E° e parametri di selettività per vari solventi.

Solvent	Polarity E°	Dipole parameter	Proton acceptor parameter	Proton donor parameter
n-Pentane	0.00	0	0	0
Hexane	0.00	0	0	0
Petroleum ether	0.01	0	0	0
Cyclohexane	0.04	0	0	0
Carbon tetrachloride	0.15	0	0.5	0
Butyl chloride	0.26	3	0	0
Xylene	0.26	0	0.5	0
Isopropyl ether	0.28	0.5	0.5	0
Isopropyl chloride	0.29	3	0	0
Toluene	0.29	0	0.5	0
Benzene	0.32	0	0.5	0
Diethyl ether	0.38	2	2	0
Chloroform	0.40	3	0.5	3
Dichloromethane	0.42	5.5	0.5	0
Tetrahydrofuran	0.45	4	3	0
1,2-Dichloroethane	0.49	4	0	0
Methyl ethyl ketone	0.51	5	2	0
Acetone	0.56	5	2.5	0
Dioxane	0.56	4	3	0
Ethyl acetate	0.58	3	2	0
Diethylamine	0.63			

Solvent	Polarity E°	Dipole parameter	Proton acceptor parameter	Proton donor parameter
Nitromethane	0.64	8	1	0
Acetonitrile	0.65	8	2.5	0
Pyridine	0.71	4	5	0
Propanol	0.71	2.5	4	4
Ethanol	0.88	4	5	5
Methanol	0.95	5	7.5	7.5
Water	large	large	large	large

Per un dato flusso della fase mobile, il fattore di capacità influenza il tempo di ritenzione, cosa evidente dalla seguente relazione:

Equazione 21:
Tempo di ritenzione.

$$t_R = \frac{L}{u} \cdot (1+k')$$

u = Linear flow rate, cm/min or mm/s
L = Column length in cm or mm

In generale, si applicano dunque i seguenti principi:

Valori di k' grandi = tempi di separazione lunghi

Valori di k' piccoli = tempi di separazione corti

Aumentando la polarità della fase si riducono i valori di k'. (Questo per fasi stazionarie polari; vale il contrario nel caso di fasi inverse!)

I valori di k' ideali per lavorare nella pratica stanno nell'intervallo fra 1 e 5. Ciò corrisponde a un valore di R_f fra 0.5 e 0.17 in TLC (vedi anche la sezione 9).

8.2 Il fattore di separazione α

Il fattore di separazione α, chiamato anche ritenzione relativa, è una misura della selettività di un sistema cromatografico. È possibile, data una fase mobile ed una stazionaria, valutare se e con quale sforzo due sostanze possono essere separate.

Il fattore di separazione α può essere calcolato come segue:

Equazione 22:
Fattore di separazione α.

$$\alpha = \frac{t_{R2} - t_0}{t_{R1} - t_0} \quad \text{for } t_{R2} \geq t_{R1}$$

Se i due tempi di ritenzione t_{R2} e t_{R1} sono uguali, il fattore di separazione α assume il valore di 1. Una miscela per cui α = 1, quindi, non può essere separata. Maggiore è il fattore di separazione, più semplice la separazione.

In questo contesto, una separazione più semplice significa richieste meno stringenti in termini di efficienza della colonna e quindi la possibilità di effettuare la separazione con adsorbenti più economici.

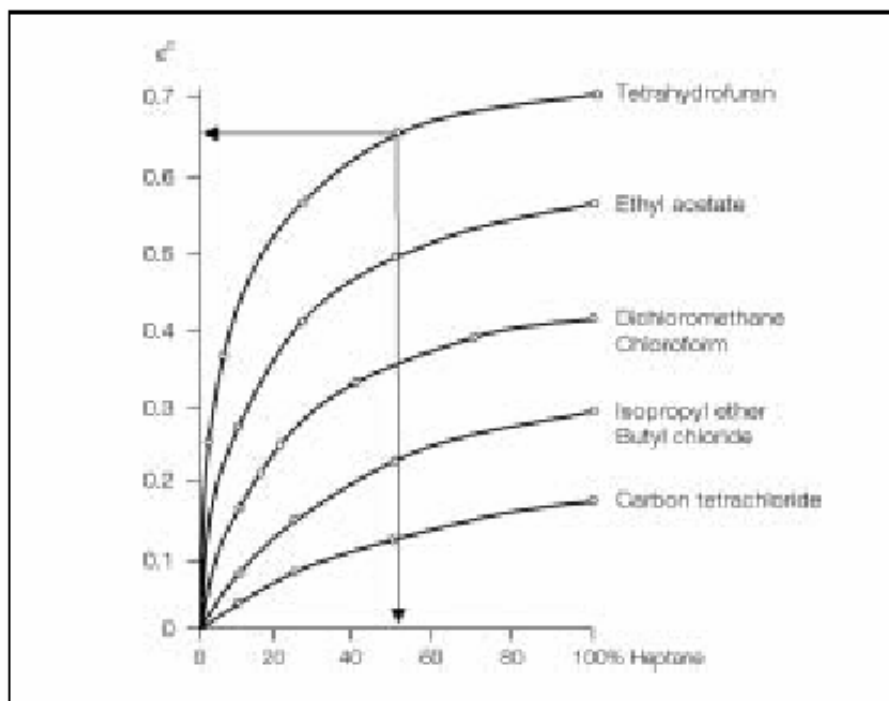
Per una data fase stazionaria, il fattore di separazione α può essere influenzato dalla scelta della fase mobile. I parametri selettivi del solvente, come i parametri di dipolo, di accettore di protone e di donatore di protone, sono svariati. Questi parametri sono elencati per alcuni solventi nella tabella sottostante.

Tabella 10:
Fattori di selettività dei solventi

Solvent	Dipole parameter	Proton acceptor parameter	Proton donor parameter
n-Pentane	0	0	0
Hexane	0	0	0
Petroleum ether	0	0	0
Cyclohexane	0	0	0
Carbon tetrachloride	0	0.5	0
Butyl chloride	3	0	0
Xylene	0	0.5	0
Isopropyl ether	0.5	0.5	0
Isopropyl chloride	3	0	0
Toluene	0	0.5	0
Benzene	0	0.5	0
Diethyl ether	2	2	0
Chloroform	3	0.5	3
Dichloromethane	5.5	0.5	0
Tetrahydrofuran	4	3	0
1,2-Dichloroethane	4	0	0
Methyl ethyl ketone	5	2	0
Acetone	5	2.5	0
Dioxane	4	3	0
Ethyl acetate	3	2	0
Diethylamine			
Nitromethane	8	1	0
Acetonitrile	8	2.5	0
Pyridine	4	5	0
Propanol	2.5	4	4
Ethanol	4	5	5
Methanol	5	7.5	7.5
Water	large	large	large

In pratica, è veramente raro che un solvente puro possieda esattamente la polarità e la selettività corrette per risolvere un problema di separazione. Ciò che capita più frequentemente è una selettività adatta accoppiata con una polarità troppo alta, e viceversa. In tutti questi casi, quindi, bisogna preparare una miscela di solventi costituita da due o tre solventi individuali. Praticamente non risulta difficile definire i parametri di selettività. D'altra parte, è più difficile stimare il rapporto in cui miscelare i solventi, richiesto per ottenere la polarità desiderata. A questo proposito, si dovrebbe notare che la polarità della miscela non si basa su una funzione lineare. Come mostrato nella figura sotto, le miscele riportate forniscono polarità sostanzialmente più alte di quanto atteso.

Figura 24:
Polarità E° di miscele di solventi (da [5] per gentile concessione di Perkin Elmer).



Invece dell'eptano, è anche possibile usare esano, cicloesano o etere di petrolio.

Un altro aiuto nell'ottimizzazione della fase mobile (valori di α e k') è il triangolo di selettività inventato da Snyder. Qui i solventi comuni sono stati divisi in otto gruppi di selettività a seconda delle loro proprietà selettive risultanti, e questi gruppi sono stati organizzati in un triangolo i vertici del quale indicano le proprietà di dipolo, accettore di protone e donatore di protone. Così abbiamo una rappresentazione molto chiara delle proprietà del solvente.

Figura 25:
Triangolo delle selettività

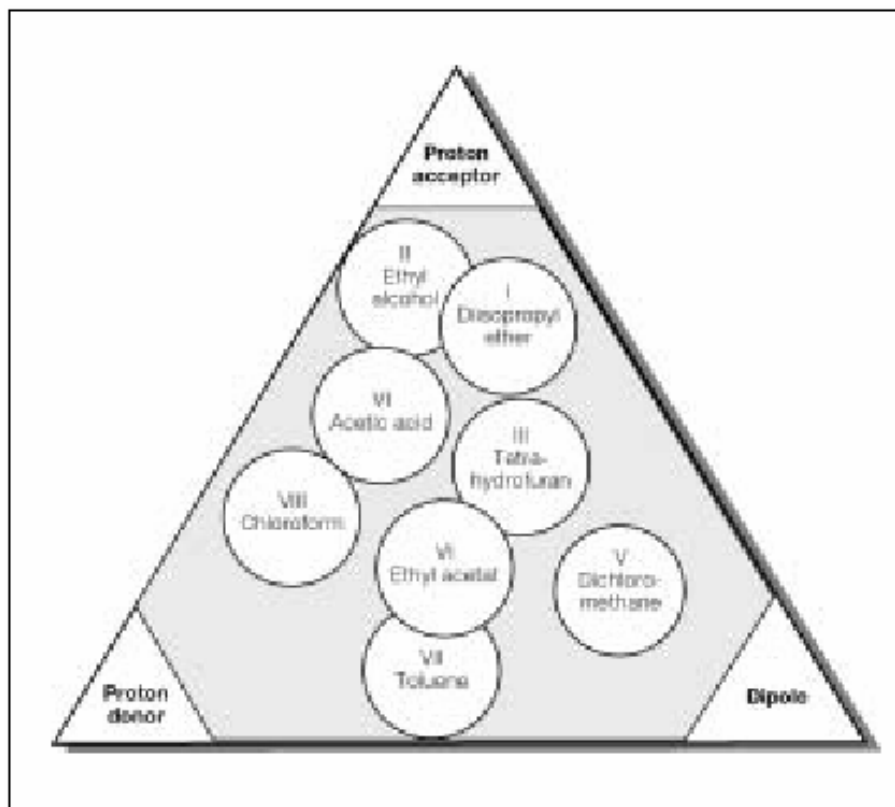


Tabella 11:
Gruppi di selettività ed esempi

Solvent	Group	Strength S_1	UV limit
n-Hexane	-	0.1	200
Cyclohexane	-	0.2	210
Diisopropyl ether	I	2.4	220
Diethyl ether	I	2.8	220
Ethanol	II	4.3	200
Methanol	II	5.1	200
Tetrahydrofuran	III	4.0	220
Acetic acid	IV	6.0	
Dichloromethane	V	3.1	250
Ethyl acetate	VI	4.4	260
Aceton	VI	5.1	330
Acetonitrile	VI	5.8	210
Toluene	VII	2.4	290
Xylene	VII	2.5	290
Chloroform	VIII	4.1	250

Anche in questo caso, comunque, rimane il problema di avere polarità inadatte e delle corrispondenti difficoltà di miscelazione. Così, invece della polarità (scala di Hildebrand), Snyder usò la forza del solvente (basata su valori determinati sperimentalmente). Questa forza del solvente dà come risultato un cambio nella miscelazione additivo, cioè otteniamo una miscela di forza attesa. I dati appropriati sono riassunti nella Tabella 12.

Tabella 12:
Forza del solvente e gruppi di
selettività per alcuni solventi
comuni.

Solvent	Solvent strength S_1	Selectivity group
n- Pentane	0.0	–
Hexane	0.1	–
Petroleum ether	0.2	–
Cyclohexane	– 0.2	–
Carbon tetrachloride	1.6	–
Butyl chloride	– 0.2	VI
Xylene	2.5	VII
Isopropyl ether	2.4	II
Isopropyl chloride	1.2	VI
Toluene	2.4	VII
Benzene	2.7	VII
Diethyl ether	2.8	I
Chloroform	4.1	VIII
Dichloromethane	3.1	V
Tetrahydrofuran	4.0	III
1,2-Dichloroethane	3.5	V
Methyl ethyl ketone	4.7	VI
Acetone	5.1	VI
Dioxane	4.8	VI
Ethyl acetate	4.4	VI
Triethylamine	1.9	I
Nitromethane	6.0	VII
Acetonitrile	5.8	VI
Pyridine	5.3	III
Propanol	3.9	II
Ethanol	4.3	II
Methanol	5.1	II
Water	10.2	VIII

Usando come parametro la forza del solvente S_i invece della polarità E^0 , si nota come la forza di un solvente più forte possa essere ridotta a quella di uno più debole semplicemente aggiungendo esano.

Esempio: Quanto esano si deve mischiare con etile acetato in modo che l'etile acetato abbia la stessa forza del diclorometano? S_i del diclorometano = 3.1, S_i dell'etile acetato = 4.4, S_i dell'esano = 0.

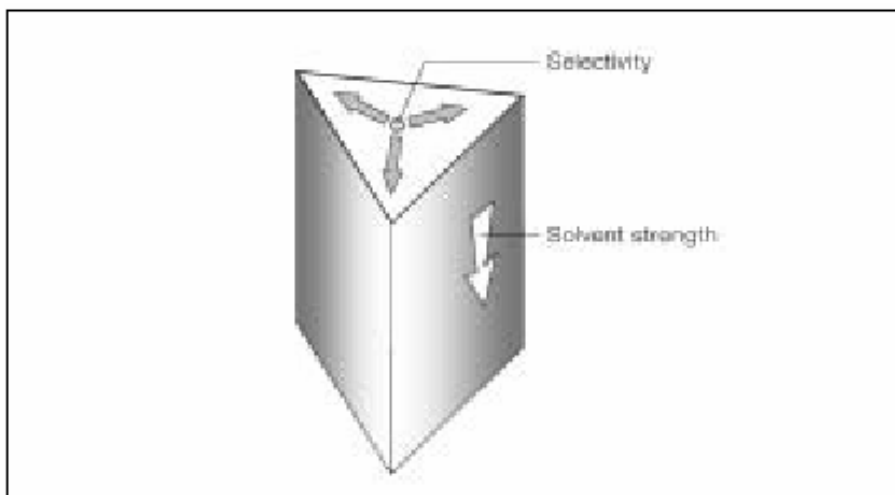
Equazione 23:
Esempio di calcolo della forza del solvente

$$\% \text{ ethyl acetate } (S_i = 3.1) = \frac{3.1 \cdot 100}{4.4} = 70.45\%$$

Pertanto una miscela al 70.45% di etile acetato ed al 29.55% di esano ha la stessa forza del solvente del diclorometano (vedi anche la sezione 9.3, valutazione della fase mobile per TLC).

In termini grafici, gli intervalli di miscelazione per i solventi possono essere descritti in termini di un prisma, che può essere rappresentato come segue:

Figura 26:
Prisma per la valutazione della fase mobile.



8.3 Effetto di α e k' sulla risoluzione

Il fattore di separazione α ed il fattore di capacità k' possono essere determinati analiticamente in maniera molto semplice, per esempio per TLC (vedi la sezione 9.2.2). La relazione fra il fattore di separazione α , il fattore di capacità k' , il numero di piatti N e la risoluzione R è descritta dalla seguente equazione:

Equazione 24:
Risoluzione come funzione di α e di k'

$$R = \frac{1}{4} \cdot \sqrt{N \cdot \frac{(\alpha - 1) \cdot k'_2}{\alpha \cdot (k'_2 + 1)}}$$

Basandosi sull'equazione cromatografica descritta sopra, il numero di piatti teorici N richiesti per una separazione può essere calcolato per un fattore di separazione α ed un fattore di capacità k' noti. Inoltre, la risoluzione R attesa può essere calcolata per colonne con caratteristiche note.

8.4 Effetto di α e k' sul numero di piatti teorici N

Per una separazione preparativa, è importante conoscere l'efficienza della colonna richiesta allo scopo separare efficacemente una data miscela. Per questo scopo, l'equazione 20 viene modificata per ottenere N , ed R è posto uguale ad 1.0:

Equazione 25:
Numero di piatti teorici come
funzione di α e k'

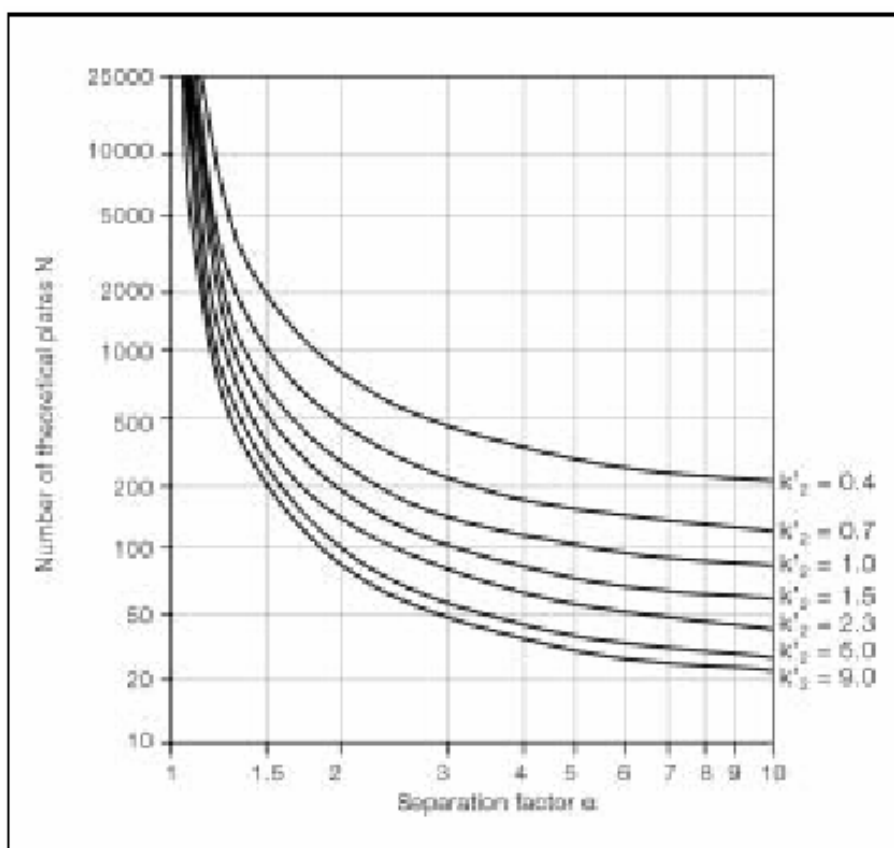
$$N = \left(\frac{4 \cdot \alpha \cdot (k'_2 + 1)}{k'_2 \cdot (\alpha - 1)} \right)^2$$

La figura 27 mostra la dipendenza del numero di piatti teorici N dal fattore di separazione α per valori di k'_2 che vanno da 9 a 0.43 per una separazione con risoluzione $R = 1.0$. Per illustrare tale situazione, i valori di R_f in TLC che corrispondono a particolari valori di k'_2 sono riassunti sotto nella tabella 13 (vedi anche la sezione 9):

Tabella 13:
 R_f e corrispondenti valori k'_2

k'_2	R_f	k'_2	R_f
9	0.1	1	0.5
5	0.2	0.6	0.6
2.3	0.3	0.43	0.7
1.5	0.4		

Figura 27:
Dipendenza del numero di piatti
teorici necessaria per per una
separazione di $R = 1.0$ sui fattori di
separazione α e K'_2



8.5 Effetto delle dimensioni delle particelle sull'efficienza della colonna

Un'altra equazione basilare della cromatografia è l'equazione di van Deemter:

Equazione 26:
Equazione di van Deemter

$$H = A + \frac{B}{u} + C \cdot u$$

Con

Equazione 27:
Parametro A di van Deemter

$$A = 2 \cdot \lambda \cdot d_p$$

Equazione 28:
Parametro B di van Deemter

$$B = 2 \cdot \gamma \cdot D_m$$

Equazione 29:
Parametro C di van Deemter

$$C = \frac{w \cdot d_p^2}{D_m} + C_s$$

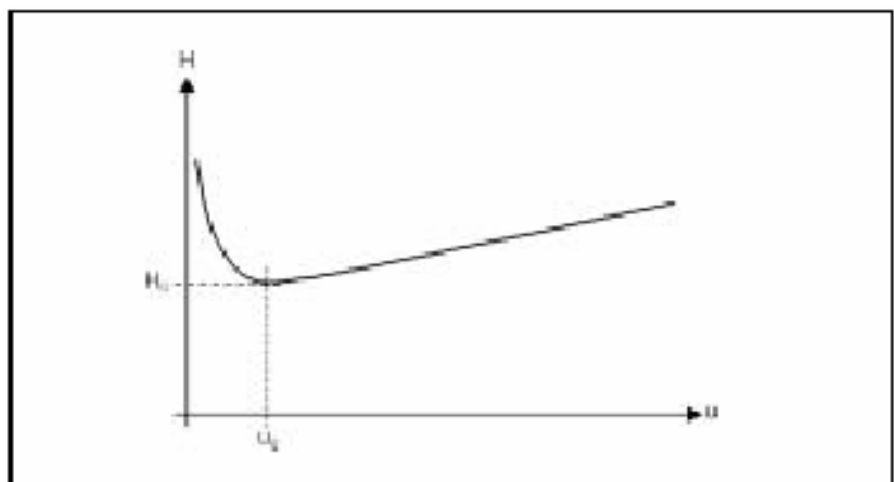
In una loro pubblicazione, Halász *et al.* suggeriscono valori guida pratici per le costanti A, B e C, che semplificano molto l'applicazione di tale equazione. Pertanto una buona approssimazione si ottiene con:

Equazione 30:
Approssimazione di van Deemter

$$H = 3 \cdot \frac{6}{u} + \frac{\phi^2}{16} \cdot u$$

Questa equazione mostra chiaramente che l'altezza del piatto H e quindi il numero dei piatti N di una colonna sono determinati principalmente dal diametro delle particelle dell'adsorbente d_p e dal flusso lineare u . L'altezza del piatto H raggiunge una altezza teorica del piatto minima (= H_0) ad una certa velocità di flusso lineare, ed aumenta ancora con un flusso crescente.

Figura 28:
Curva di van Deemter



Gli adsorbenti impiegati nella cromatografia preparativa a media pressione non hanno dimensioni delle particelle uniformi mostrando invece un intervallo più ampio o più stretto nelle dimensioni delle particelle. Strettamente parlando, sarebbe necessario determinare le dimensioni dinamiche della particella attiva ed usare questo valore nei calcoli. Comunque, questo calcolo richiede un certo sforzo, ed è stato trovato in pratica che, per tali considerazioni, in cromatografia preparativa a media pressione, si può impiegare il valore maggiore dell'intervallo delle particelle, senza nessuno svantaggio.

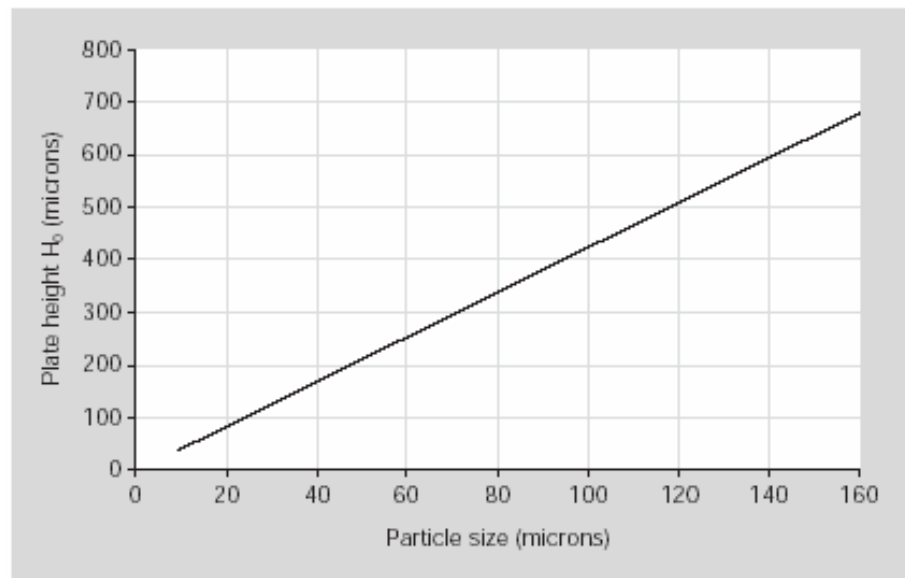
Ogni adsorbente ha un intervallo ottimale nelle dimensioni delle particelle in relazione al flusso lineare ed all'efficienza.

Se l'altezza ottimale del piatto H_0 per adsorbenti che hanno diverse dimensioni delle particelle viene determinata usando l'equazione 30, si ottengono i seguenti risultati:

Tabella 14:
Dipendenza della altezza minima di piatti teorici H_0 con la dimensione dell particelle

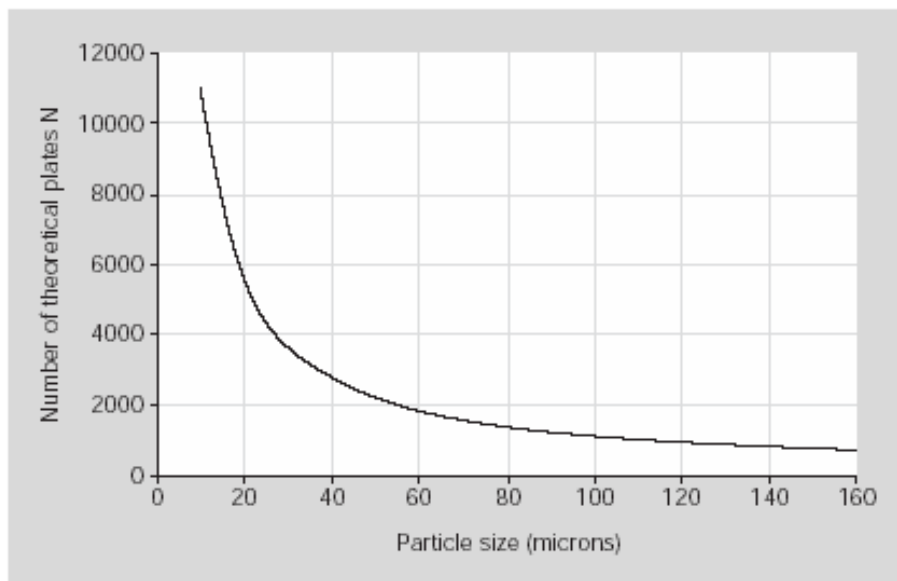
dp (μm)	H_0 (μm)	u_0 (mm/s)	dp (μm)	H_0 (μm)	u_0 (mm/s)
10	42	0.9	80	338	0.12
20	84	0.5	100	422	0.10
30	127	0.32	120	507	0.08
40	169	0.24	140	593	0.07
50	211	0.20	160	676	0.06
60	254	0.16			

Figura 29:
Dipendenza della altezza minima di piatti teorici H_0 con la dimensione dell particelle.



A loro volta, da questi dati, e per una data lunghezza della colonna, è possibile determinare il massimo numero possibile di piatti teorici per la colonna come funzione delle dimensioni delle particelle:

Figura 30:
Dipendenza del numero dei piatti teorici N di una colonna con $L = 460$ mm con la dimensione dell particelle.

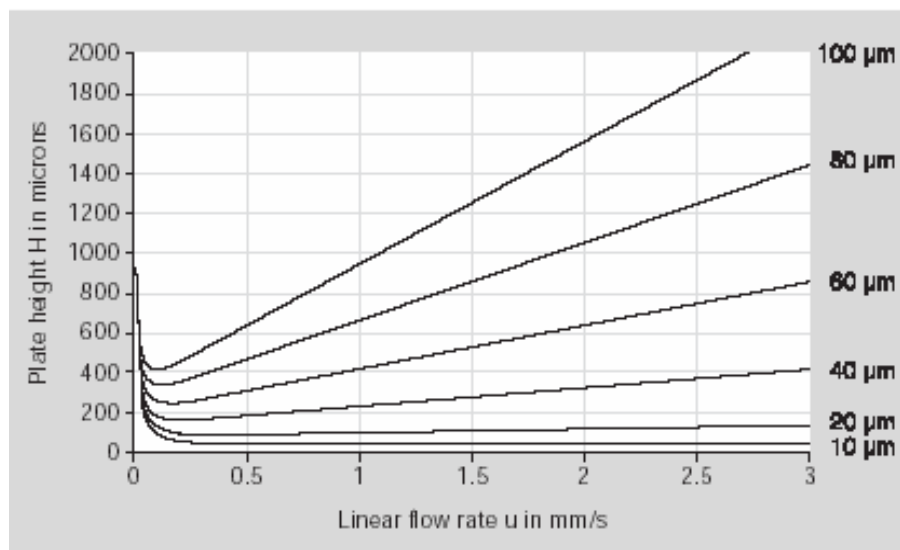


Ovviamente una colonna può funzionare efficacemente se è impaccata correttamente, indipendentemente dall'assorbente usato.

8.6 Effetto della velocità del flusso sull'efficienza della colonna.

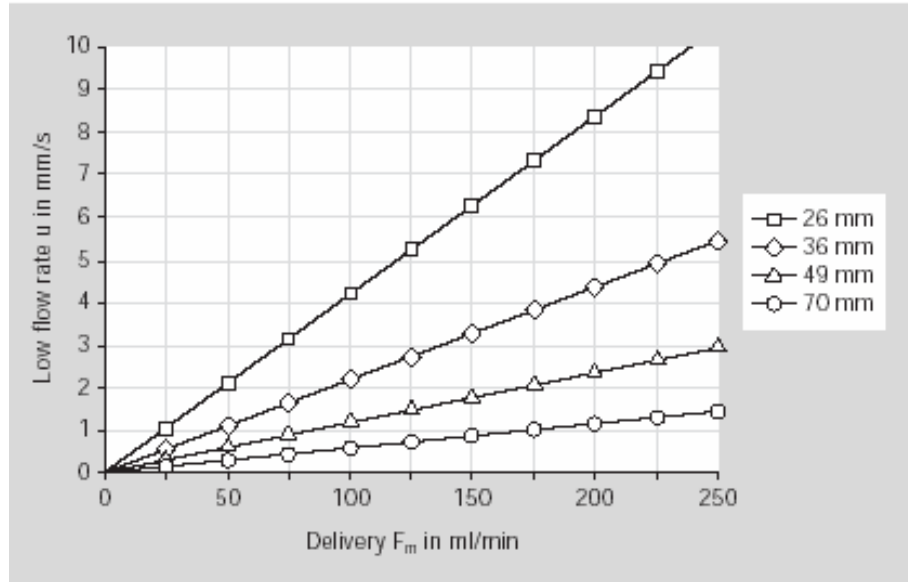
Come già accennato nella sezione 8.5, il flusso lineare influenza l'altezza dei piatti teorici (equazioni 38 e 30). Maggiore è l'altezza del piatto H , minore è il numero dei piatti teorici e quindi l'efficienza della colonna di una data lunghezza. Se le curve di van Deemter sono calcolate per adsorbenti di dimensioni diverse, si ottiene la seguente figura.

Figura 31:
Dipendenza dell'altezza del singolo piatto teorico H con la velocità del flusso per adsorbenti di diverse dimensioni.



L'efficienza della colonna mostra una maggiore dipendenza dalla velocità del flusso nel caso di assorbenti più grossi che nel caso di particelle più fini. La relazione tra velocità del flusso lineare u e la distribuzione F_m è mostrato nella curva di figura 32.

Figura 32:
Dipendenza della velocità del flusso lineare u con la distribuzione F_m calcolata per colonne Büchi di 26-70 mm di diametro.



Equazione 31:
Velocità del flusso come funzione della distribuzione.

$$u = \frac{F_m}{6 \cdot r^2 \cdot \pi}$$

8.7 Effetto della lunghezza della colonna sul numero di piatti teorici.

Il numero di piatti di una colonna N è dato dal rapporto tra la lunghezza della colonna L e l'altezza del singolo piatto H

Equazione 32:
Numero di piatti teorici

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

Riassumendo, il numero di piatti è proporzionale alla lunghezza della colonna ed all'altezza del piatto calcolati secondo le equazioni 30 e 32

8.8 Effetto della lunghezza della colonna sulla risoluzione.

Le colonne più lunghe, anche se migliorano la risoluzione, fanno lievitare i costi.

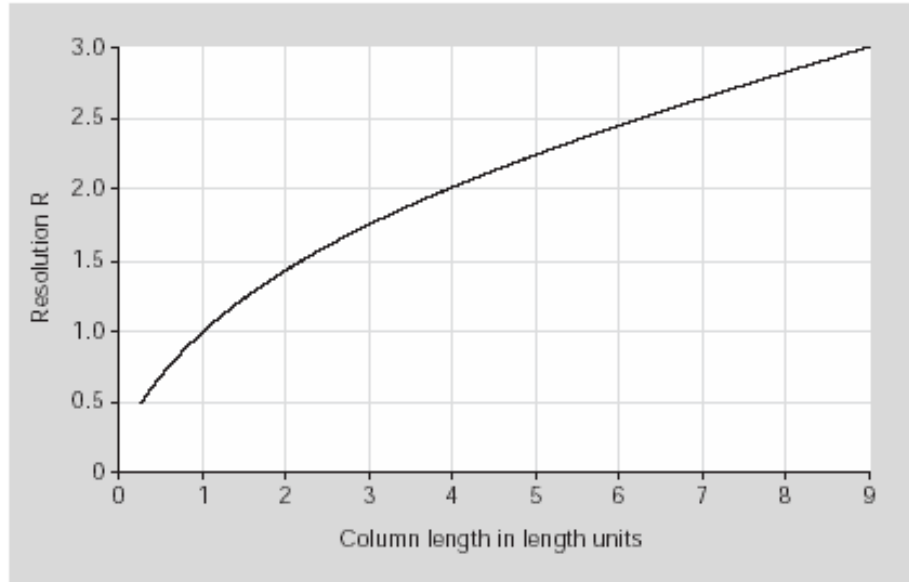
La risoluzione R è descritta dalla seguente equazione.

Equazione 33:
Risoluzione

$$R = \frac{1}{4} \cdot \sqrt{N \cdot \frac{(\alpha-1) \cdot k'_2}{\alpha \cdot (k'_2+1)}}$$

Risulta chiaro da questa equazione che la risoluzione R è funzione quadratica inversa del numero dei piatti teorici. Poiché però il numero dei piatti è proporzionale alla lunghezza della colonna, si ha che: per ottenere un incremento di 2.0 volte una risoluzione la colonna dovrebbe essere almeno 4 volte più lunga di quella usata precedentemente.

Figura 33:
Dipendenza della
risoluzione con la
lunghezza della colonna.

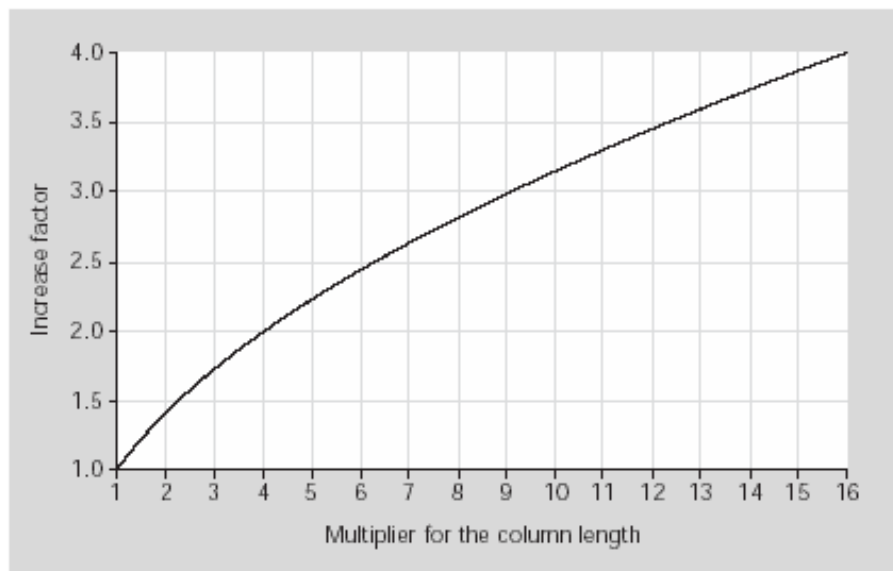


La relazione diviene ancora più chiara quando, come nel caso di figura 34, l'aumento del fattore di risoluzione è riportato contro il multiplo della lunghezza della colonna. Il fattore di aumento della risoluzione è definito come:

Figura 34

$$\text{Increase factor} = \frac{R_{\text{desired}}}{R_{\text{obtained}}}$$

Figura 34:
Dipendenza della
lunghezza della colonna
con l'aumento del fattore di
risoluzione.



Il grafico in figura 34 permette di determinare in maniera semplice la lunghezza della colonna necessaria per una certa risoluzione quando, ad esempio, un test cromatografico mostra una risoluzione insufficiente. L'esempio seguente mostra una possibile applicazione.: Il cromatogramma di controllo mostra una lunghezza di 230 mm per una risoluzione di $R = 0.8$. E' però necessario arrivare ad un fattore di 1.2. Qual è la lunghezza minima di colonna necessaria ?.

Soluzione. Riferendosi al grafico in figura 34:

moltiplicare R per il la lunghezza della colonna : = 2.24. Lunghezza richiesta per R 1.2 : 230 mm x 2.24 = 515 mm.

La figura 34 permette anche di determinare una lunghezza idonea quando la risoluzione è troppo elevata (con risparmio di tempo). Il reciproco del fattore di aumento della risoluzione deve essere utilizzato in questo caso, e la nuova lunghezza della colonna è ottenuta dividendo la lunghezza originale della colonna per il numero determinato come moltiplicatore. L'esempio descritto precedentemente mostra chiaramente che aumentando la risoluzione solo per la lunghezza della colonna comporta un grande spreco di materiale e di tempo. Pertanto è sempre consigliabile determinare se si può trovare una fase mobile con valori di k_2' maggiori o con maggiori valori di α relativi alla miscela da separare.

8.9 Cromatografia con più colonne in serie.

Più colonne possono essere collegate in serie con il fine di migliorare l'efficienza della separazione. In un loro lavoro, Kwow e coll hanno indicato che il numero risultante dei piatti teorici in un caso come questo non è la mera somma del numero dei piatti delle colonne separate, Il valore effettivo H_g corrisponde alla somma del numero dei piatti teorici pesata per la lunghezza delle varie colonne utilizzate in serie.

Equazione 35:
Altezza dei piatti

$$H_g = \frac{\sum H_i \cdot L_i}{L_g}$$

Il valore N_g della combinazione finale risulta pertanto essere:

Equazione 36:
numero dei piatti.

$$N_g = \frac{L_g}{H_g}$$

Nota. Una colonna "scarsa" ha un effetto devastante sull'efficienza di tutta la combinazione. Pertanto in casi come questo è consigliabile usare colonne di efficienza comparabile. Combinare una buona colonna con una cattiva colonna risulta in una colonna pessima !

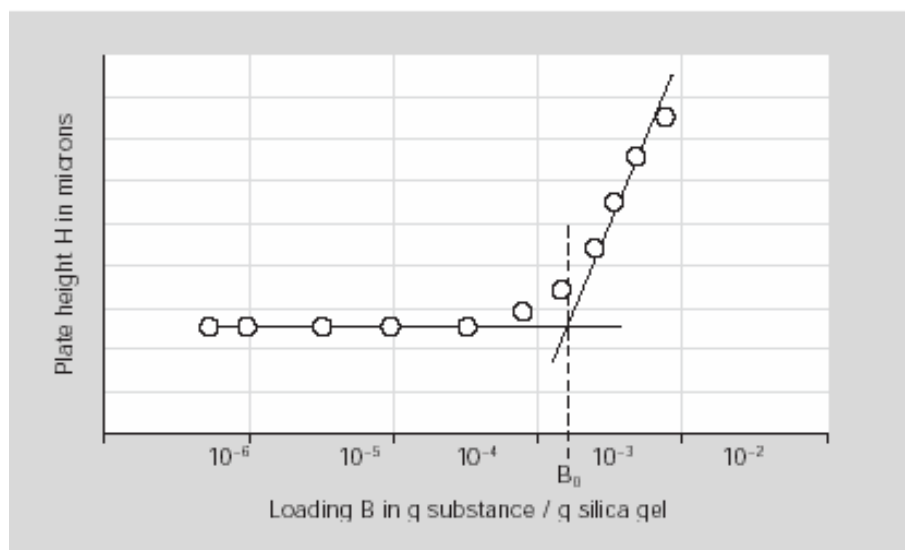
8.10 Carico.

Il carico B è la quantità di sostanza introdotta nella colonna, espressa come grammi di sostanza per grammi di assorbente presenti nella colonna. E' impossibile dare informazioni generali su questo argomento in quanto il massimo possibile di carico dipende dai valori di α e k' delle varie colonne.

Se si considera però l'altezza dei piatti della colonna rispetto al carico, si trova che l'altezza dei piatti rimane costante fino ad un certo valore di carico e poi diminuisce con l'aumentare del carico stesso. Il punto di flesso di questa curva è definito come la capacità lineare B_0 . Pertanto B_0 si può anche definire come il carico al quale un aumento del 10% porta alla variazione dell'altezza dei piatti H.

La relazione è riportata nella figura 35.

Figura 35:
Dipendenza
dell'altezza del
piatto H con il
carico della
colonna B.



Per il gel di silice commerciale con ampiezza dei pori di 60 Å, B_0 è circa $2 \cdot 10^{-4}$ grammi di sostanza per grammo di silice (200 µg / g). Per separazioni analitiche, il carico può essere anche minore mentre la cromatografia analitica viene quasi sempre condotta in condizioni di $B > B_0$, il che significa che il gel di silice è spesso saturato. Questo significa essere in condizioni di sostanziale deviazione dalle condizioni ideali. Ci sono quindi buone ragioni per effettuare una scalatura "in alto" dalla TLC attraverso una corsa su una colonna analitica in condizioni di saturazione.

Come conseguenza di usare colonne in condizioni di sovraccarico, l'efficienza della colonna viene sacrificata. Non vi sono studi dettagliati sul comportamento delle colonne in queste condizioni di sovraccarico. Alcune osservazioni però suggeriscono che, con valori di k' di circa 0.3, una buona separazione può essere ottenuta con un carico di circa $3 \cdot 10^{-2}$ (30 mg di sostanza per grammo di silice). Tale carico può addirittura essere aumentato riducendo il fattore W ed aumentando il fattore di separazione α attraverso un'appropriata modifica della fase mobile. Valori di carico alti riducono k' e diminuiscono i tempi di ritenzione. Carichi elevati riducono, ovviamente, la risoluzione come si può verificare risolvendo l'equazione 33.

9. Uso della cromatografia su strato sottile come modello per la cromatografia preparativa su colonna.

L'identificazione del sistema e dei parametri appropriati per la cromatografia assicura il successo della separazione in termini di selettività, risoluzione e resa in prodotto separato.

I meccanismi di separazione (basati su polarità, dimensioni dei pori, forma, carica ecc) devono determinati per primi. Questi fattori controllano il tipo di cromatografia da scegliere per condurre la separazione (cioè se tentare una cromatografia di adsorbimento, esclusione dimensionale o scambio ionico).

Per la cromatografia di assorbimento va considerato che la TLC è un metodo ben consolidato per acquisire tutte le informazioni per condurre una cromatografia su colonna efficace. Condizione indispensabile è però che il tipo di adsorbente sulla TLC e nella colonna siano identici.

Vi sono varie ragioni per scegliere la TLC come tecnica per le analisi preliminari.

Infatti:

La TLC è rapida. vari solventi possono essere provati simultaneamente per scegliere la migliore fase mobile.

La TLC è facile da fare

La TLC è economica. Impegna pochissima sostanza e pochissimo tempo.

La TLC permette di identificare le sostanze per UV (usando lastre con indicatore di fluorescenza) o utilizzando reattivi di rivelazione

Le macchie delle sostanze sono facilmente visibili.

La TLC permette di ricavare i parametri k' e α in maniera semplici.

Concludendo, un'analisi preliminare per TLC è indispensabile per poter condurre correttamente una cromatografia su colonna.

9.1 Una breve introduzione alla TLC

Il sistema cromatografico più semplice è la cromatografia su strato sottile.

La procedura richiede l'applicazione di una goccia di una soluzione del campione applicata a circa 1 cm di distanza dalla base di una lastrina rettangolare per TLC su cui è stata applicata la stessa fase stazionaria che si dovrebbe usare nella separazione preparativa. La lastrina è poi introdotta in una recipiente chiuso contenente la fase mobile la cui superficie deve essere inferiore del punto della lastrina su cui è stata posta la sostanza. Il solvente sale per capillarità e funziona da fase mobile per le sostanze da separare. Mentre i componenti sono spinti in su dall'eluente, i componenti della miscela sono separati in funzione della loro forza di interazione con la fase stazionaria rispetto alla fase mobile. Se la fase stazionaria è polare (gel di silice) le sostanze meno polari interagiscono meno e sono spinte più in alto rispetto alle più polari.

Il fronte del solvente serve come linea di riferimento per determinare l' R_f dei vari componenti della miscela.

Figura 36
Cromatografia su strato sottile.
Apparecchiatura.

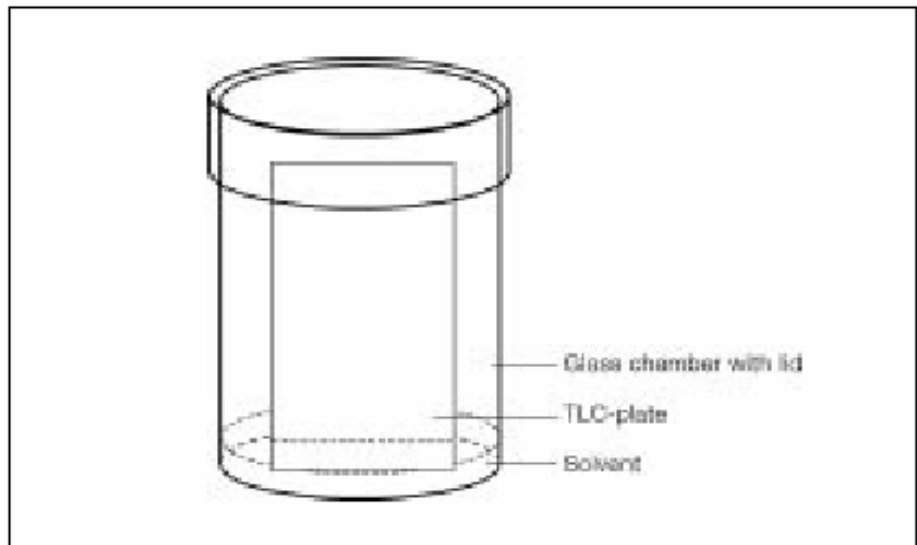
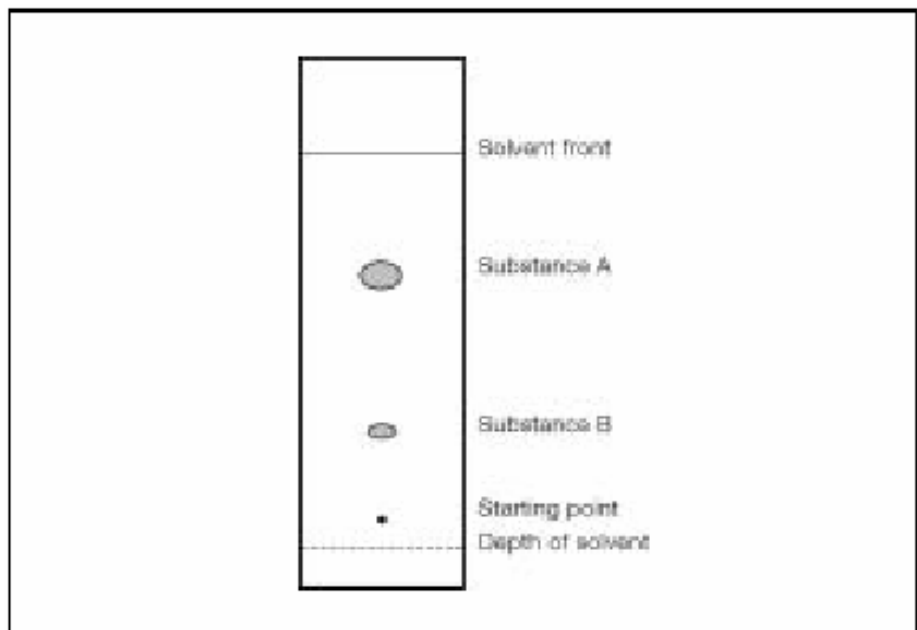


Figura 37:
Lastrina (o piastrina) per TLC.



9.2. Interpretazione dei dati della TLC.

9.2.1 Calcolo dell' R_f .

IL valore di R_f è il principale dato ricavabile dalla TLC. Si definisce come:

Equazione 37:
Calcolo dell' R_f .

$$R_f = \frac{\text{solute distance}}{\text{mobile phase distance}}$$

Per ogni macchia, la distanza si misura dal punto di partenza (o punto di deposizione). Il calcolo si effettua considerando il cento della macchia (che dovrebbe essere rotondeggiante).

9.2.2 Calcolo dei fattori α , k' e N

Come è già stato accennato, la separazione cromatografica può essere quantizzata attraverso i parametri di fattore di capacità k' ed il fattore di separazione α . Questi due fattori possono essere determinati attraverso una TLC in scala analitica dai valori di R_f applicando le seguenti relazioni:

Equazione 38:
Calcolo del fattore di capacità

$$k' = \frac{1}{R_f} - 1$$

Equazione 39:
Calcolo del fattore di separazione

$$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1}$$

Equazione 40:
Numero dei piatti.

$$N = \left(\frac{4 \cdot \alpha \cdot (k'_2 + 1)}{k'_2 \cdot (\alpha - 1)} \right)^2$$

La TLC deve essere ottimizzata per determinare le condizioni che permettano la successiva separazione più semplice. Il principale obiettivo qui è definire la fase mobile che dia un valore di k' più favorevole possibile. I seguenti esempi illustrano tale relazione.

Figura 38:
Esempi di ottimizzazione
di una TLC.

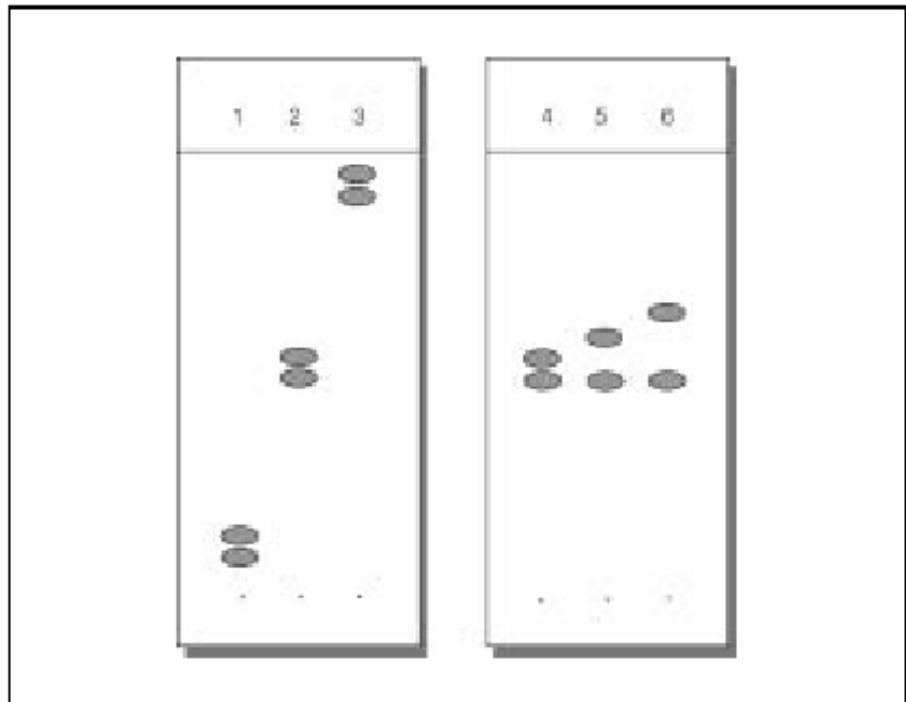
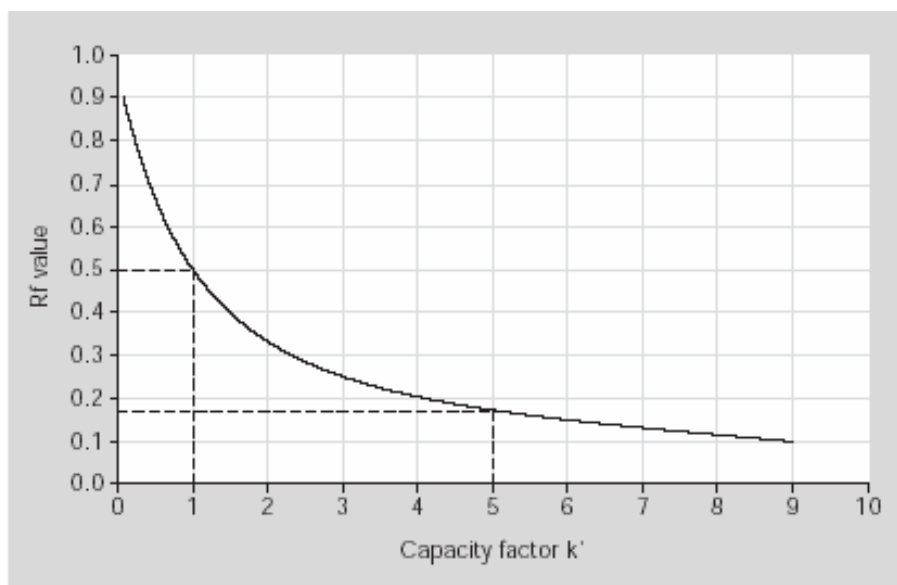


Tabella 15:
Altri esempi di ottimizzazione di TLC

Example	Rf ₀	Rf ₁₀	Rf	k' ₁	k' ₂	a	N _{R=1.0}
1	0.15	0.10	0.05	5.67	9.0	1.59	144
2	0.55	0.50	0.05	0.82	1.0	1.22	1932
3	0.95	0.90	0.05	0.05	0.1	2.11	5776
4	0.55	0.50	0.05	0.82	1.0	1.22	1932
5	0.60	0.50	0.10	0.67	1.0	1.50	576
6	0.65	0.50	0.15	0.54	1.0	1.86	300

Questi esempi mostrano chiaramente che, per una separazione con R = 1, miscele che danno R_f piccoli richiedono un minor numero di piatti teorici che quelle con R_f più grandi, e quindi risultano più semplici da separare. In termini di efficienza della colonna e tempo, i migliori valori di k' sono circa 1-5 e questo corrisponde a valori di R_f tra 0.2 e 0.5.

Figura 39:
Dipendenza del fattore k' con l'R_f.



Il fattore di capacità k'₂ influenza l'efficienza della colonna in maniera comparabile se non maggiore di α. Valori ottimali di k'₂ sono intorno a 1-5 mentre per α i valori migliori sono da 1.15 in su.

9.2.3 Risoluzione Relazione tra α e N con la risoluzione.

La relazione che intercorre tra α, il fattore di capacità k', il numero dei piatti N e la risoluzione è descritto nella seguente equazione.

Equazione 41:
Risoluzione come funzione di α e di k'.

$$R = \frac{1}{4} \cdot \sqrt{N \cdot \frac{(\alpha - 1) \cdot k'_2}{\alpha \cdot (k'_2 + 1)}}$$

9.3 Scelta della fase stazionaria e della fase mobile attraverso la TLC.

Nella scelta della fase mobile, l'obiettivo è quello di trovare il miglior solvente (o miscela di solventi) attraverso una procedura sistematica con il minor spreco di materiale possibile e nel minor tempo possibile. Un ottimo ausilio per la determinazione della fase mobile è il triangolo delle selettività secondo Snyder riportato in Figura 40.

Figura 40:
Triangolo di selettività.

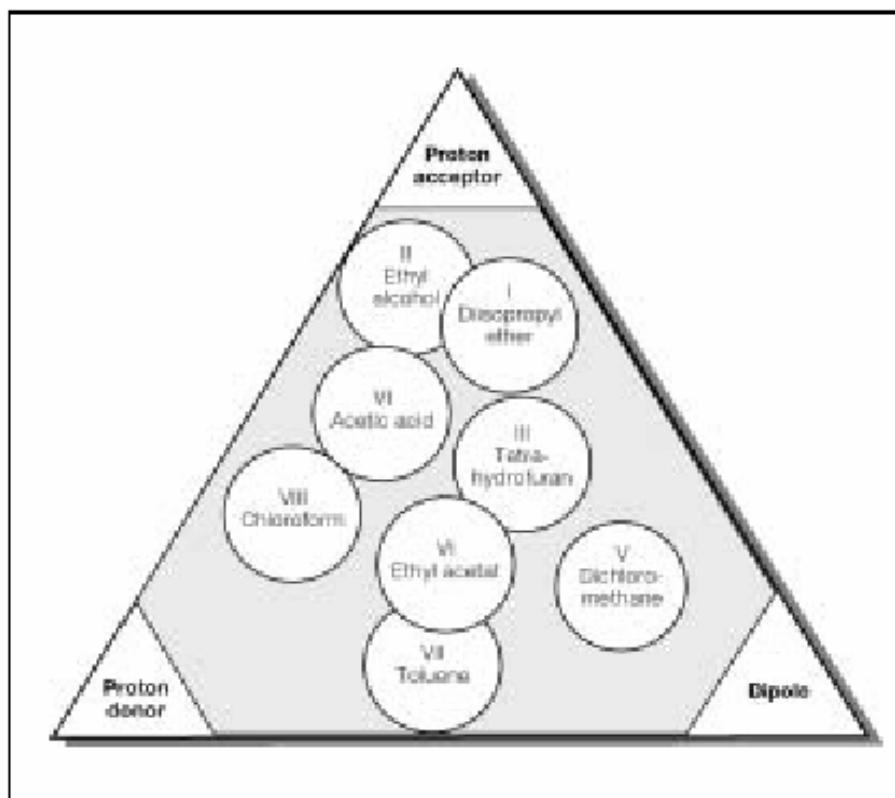


Tabella 16:
Gruppi di selettività
con esempi.

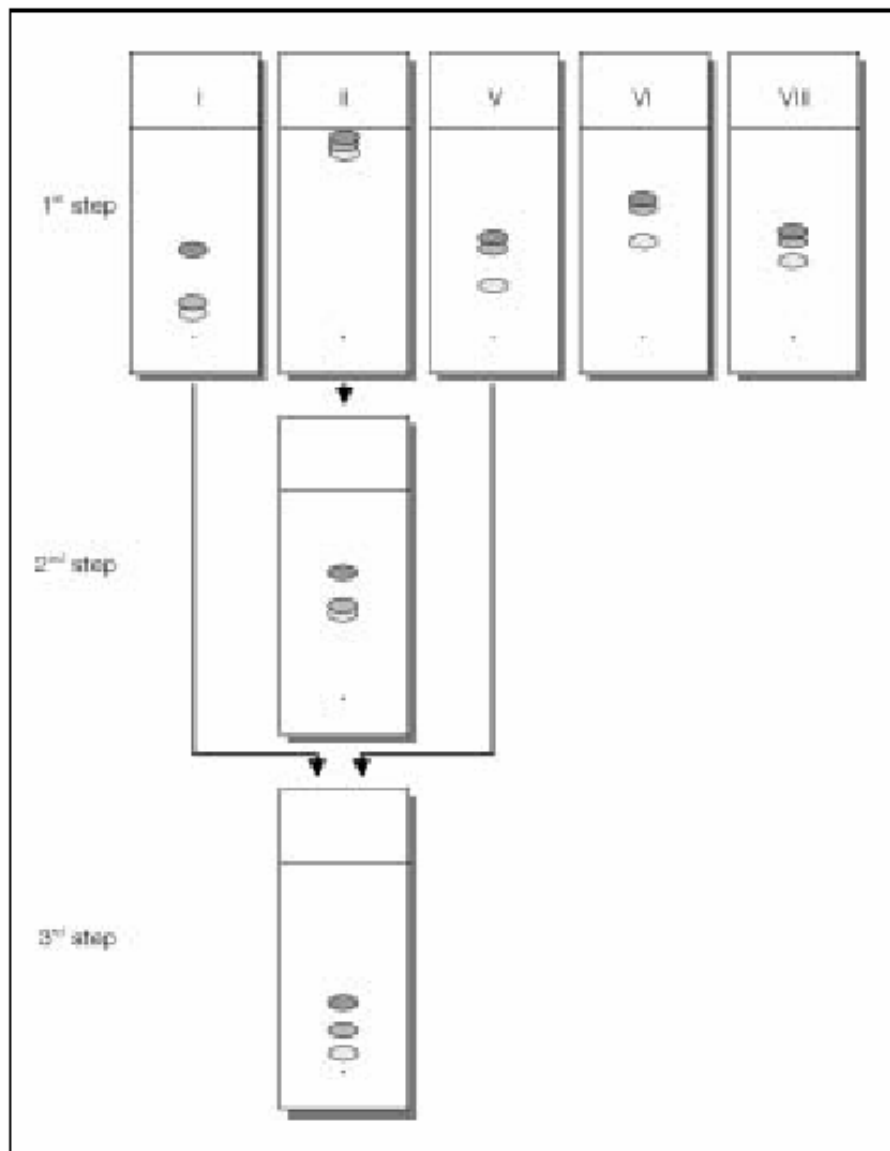
Solvent	Group	Strength S_1	UV limit
n-Hexane	-	0.1	200
Cyclohexane	-	0.2	210
Diisopropyl ether	I	2.4	220
Diethyl ether	I	2.8	220
Ethanol	II	4.3	200
Methanol	II	5.1	200
Tetrahydrofuran	III	4.0	220
Acetic acid	IV	6.0	
Dichloromethane	V	3.1	250
Ethyl acetate	VI	4.4	260
Aceton	VI	5.1	330
Acetonitrile	VI	5.8	210
Toluene	VII	2.4	290
Xylene	VII	2.5	290
Chloroform	VIII	4.1	250

Il triangolo delle selettività rende possibile con uno sguardo fare un confronto tra solventi di selettività diversa. Nel caso di miscele incognite è particolarmente importante confrontare il potere di separazione di solventi appartenenti a diversi gruppi di selettività.

Non va però dimenticato che l'ottimizzazione delle condizioni di separazione non devono compromettere la solubilità del prodotto.

Vediamo alcuni esempi di valutazione di solventi diversi:

Figura 41:
Valutazione di fasi mobili.



1° stadio: Far correre una TLC con un solvente appartenente a tutti i gruppi di selettività I, II, V, VI e VIII.

2° stadio: Ripetere le TLC che hanno $R_f > 0.8$. >ridurre la polarità dei solventi mescolandovi esano o etero di petrolio in rapporti di 1 / 3 1 / 4 (3 o 4 parti di esano).

3° stadio: Scegliere la separazione migliore. Se due o tre solventi diversi danno buoni risultati, si può provare a mescolarli in quantità uguali e ripetere la TLC.

Se i valori di R_f sono maggiori di 0.5, va sempre diminuita la polarità per aggiunta di etero di petrolio o esano (solo in caso di separazioni molto buone si può accettare un valore di $R_f > 0.5$).

Una buona procedura può essere:

- 1) tentare un solvente singolo
- 2) usare una miscela in parti uguali di due solventi di gruppi diversi se il primo stadio non ha dato buoni risultati
- 3) se ancora non si hanno buoni risultati, si possono provare miscele di solventi con capacità eluenti molto diverse tra loro, con uno dei due predominante (80% di quello che mostra Rf minore).
- 4) come ultima risorsa provare miscele ternarie (attenzione alla miscibilità).

Una volta che la fase mobile è stata ottimizzata, l'efficienza teorica della colonna necessaria per la separazione con una risoluzione di 1.0 deve essere calcolata a partire dalla TLC come segue:

Figura 42:
Calcolo dei dati di separazione ricavati da una TLC

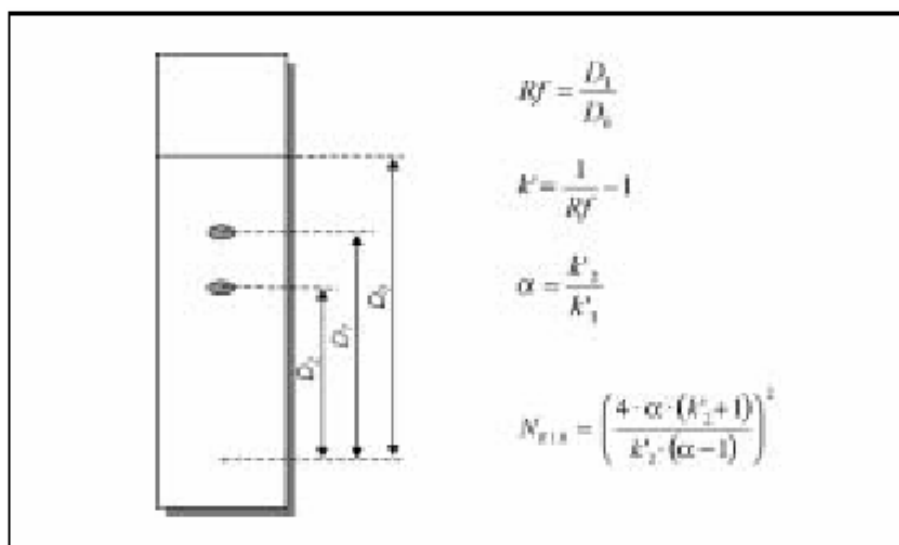
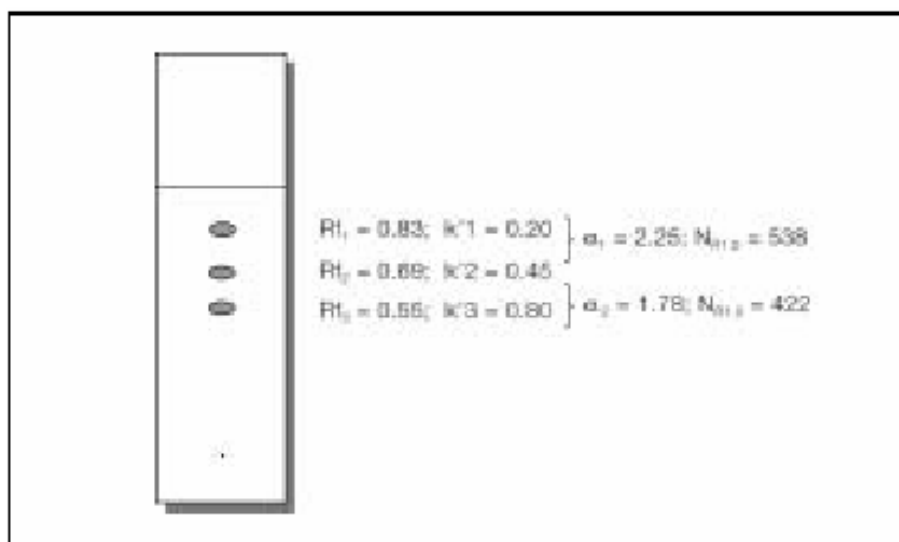


Figura 43:
Esempio pratico.



Naturalmente, i valori così ottenuti non sono dati da prendere come assoluti. Si possono infatti verificare ulteriori (piccole) differenze tra la separazione per TLC e la successiva colonna che possono influenzare la risoluzione (ad esempio l'attività della fase stazionaria, la qualità del materiale usato per l'impaccamento, il carico della colonna). Il valore ottenuto con questo metodo dovrebbe essere considerato come un dato approssimativo che però permette di scegliere una colonna con una efficienza adeguata alla separazione e stabilire se una data miscela può essere effettivamente separata. Se l'analisi TLC è stata ben fatta non si dovrebbero avere esperienze negative nello stadio preparativo con risparmio di tempo e denaro.

Come già detto, le condizioni trovate per separazioni su TLC con R_f nell'intervallo di 0.16-0.5 (k' tra 5 e 1) possono applicate senza variazioni alla colonna preparativa. E' in ogni caso buona norma ridurre la polarità della forza del solvente quando si lavora con colonne ad alto carico di sostanza o con riempimenti che hanno presumibilmente perso parte della loro attività.

10. Scelta della colonna appropriata.

La scelta della colonna idonea è strettamente legato alla quantità di prodotto (miscela) da separare. In secondo piano, anche se importanti e da valutare, sono la risoluzione richiesta ed ovviamente il costo.

Come regola generale, si suggerisce di usare 1 g di silice per ogni 30 mg di campione da caricare. Conoscendo la quantità di silice da usare e tenendo conto che la silice deve occupare non più di metà volume di una colonna, (100 g di silice si allocano in una colonna di almeno 200 mL) le dimensioni della colonna si possono determinare facilmente. Per quanto riguarda la geometria, si raccomanda di usare colonne più larghe e basse (colonne grasse) rispetto a colonne esili (strette e lunghe). Le colonne più lunghe, pur avendo un numero maggiore di piatti teorici (e quindi migliore risoluzione) presentano maggiori sovrapposizioni tra picchi contigui dovuti ad effetti di diffusione e necessitano quindi di tempi più lunghi per avere una buona risoluzione finale. Le colonne più corte si impaccano meglio ed in maniera più omogenea e sono anche più facili da maneggiare di quelle lunghe.

11. Impaccamento e condizionamento delle colonne.

11.1 Aspetti generali.

Una serie di colonne di dimensioni diverse da riempire con diversi adsorbenti da parte dell'utilizzatore stesso garantiscono vari vantaggi nella cromatografia preparativa. Pertanto non è necessario avere in magazzino varie costose colonne pre-impaccate con tipi di adsorbenti diversi. Al contrario ogni tipo di adsorbente può essere utilizzato per riempire una qualsiasi colonna vuota. Ma a questo punto ci possono essere incertezze: come si può impaccare correttamente una colonna? La letteratura descrive vari metodi di impaccamento, ma quale è il migliore ?

La selezione successiva mostra diversi modi possibili per impaccare efficacemente colonne preparative con una semplice attrezzatura presente in tutti i laboratori. I metodi riportati qui non sono ovviamente i soli disponibili. La cosa importante è usare una tecnica che permetta il riempimento nel modo più omogeneo possibile in termini di distribuzione delle particelle e di densità di impaccamento su tutta la colonna. Queste due condizioni devono essere sempre soddisfatte per ottenere colonne con alta efficienza separativa.

In generale ogni processo può essere suddiviso in tre parti: preparazione, riempimento e compattazione e tutti i metodi descritti qui sono suddivisi in questi tre stadi.

Un impaccamento omogeneo è indispensabile per ottenere una separazione netta e riproducibile. Poiché inoltre l'aggiunta della fase mobile porta a delle modifiche delle proprietà chimico fisiche dell'adsorbente, è necessario equilibrare la colonna riempita con la fase mobile prescelta prima di caricarvi la miscela. Durante questo processo di condizionamento, la fase stazionaria della colonna è portata all'equilibrio usando la fase che si utilizzerà per la separazione. Non è necessario che questo sia il solvente che si usa subito per bagnare l'adsorbente o si raggiunge per una graduale modifica del solvente. In ogni caso è necessario utilizzare le seguenti precauzioni:

Non effettuare sbalzi eccessivi di polarità. Quando questo avviene sono necessari tempi lunghi per raggiungere di nuovo l'equilibrio.

I solventi che si usano in sequenza uno dopo l'altro devono essere (ovviamente) miscibili

Si devono anche evitare di usare solventi che possono formare bolle nel mescolamento successivo (come ad esempio acqua e metanolo).

11.2 Impaccamento a secco di colonne in vetro.

Materiali.

Serie di colonne
Recipienti per il riempimento
Adsorbente
Linea di azoto con riduttore di pressione
Imbuto

Preparazione:

Lavare ed asciugare bene la colonna
Scegliere un setto poroso (frit) di dimensioni e porosità idonea per la base della colonna. Il solvente deve scolare liberamente e l'adsorbente rimanere perfettamente all'interno della colonna.
Controllare bene tutti i raccordi ed eventualmente stringerli.

Riempimento

Fissare la colonna verticalmente
Collegare bene il recipiente di riempimento.
Introdurre l'adsorbente delicatamente con l'aiuto di un imbuto.
Eventualmente smuovere l'adsorbente che rimane nell'imbutto con una bacchetta di vetro. Impaccare il recipiente di riempimento con una quantità di adsorbente che lasci libero almeno un 10% del volume occupato.

Attenzione: non dare colpi o far vibrare la colonna con l'intento di far impaccare meglio l'adsorbente. Questo porta ad una inevitabile separazione tra le particelle con perdita di efficacia.

Compattamento.

Controllare che il riduttore di pressione sia impostato a 10 bar.
Controllare che il rubinetto di fondo sella colonna sia aperto.
Collegare la colonna con la linea di azoto
Aprire la valvola dell'azoto e far passare l'azoto nella colonna finché non si ode più il fischio del gas che gorgoglia nella fase stazionaria.

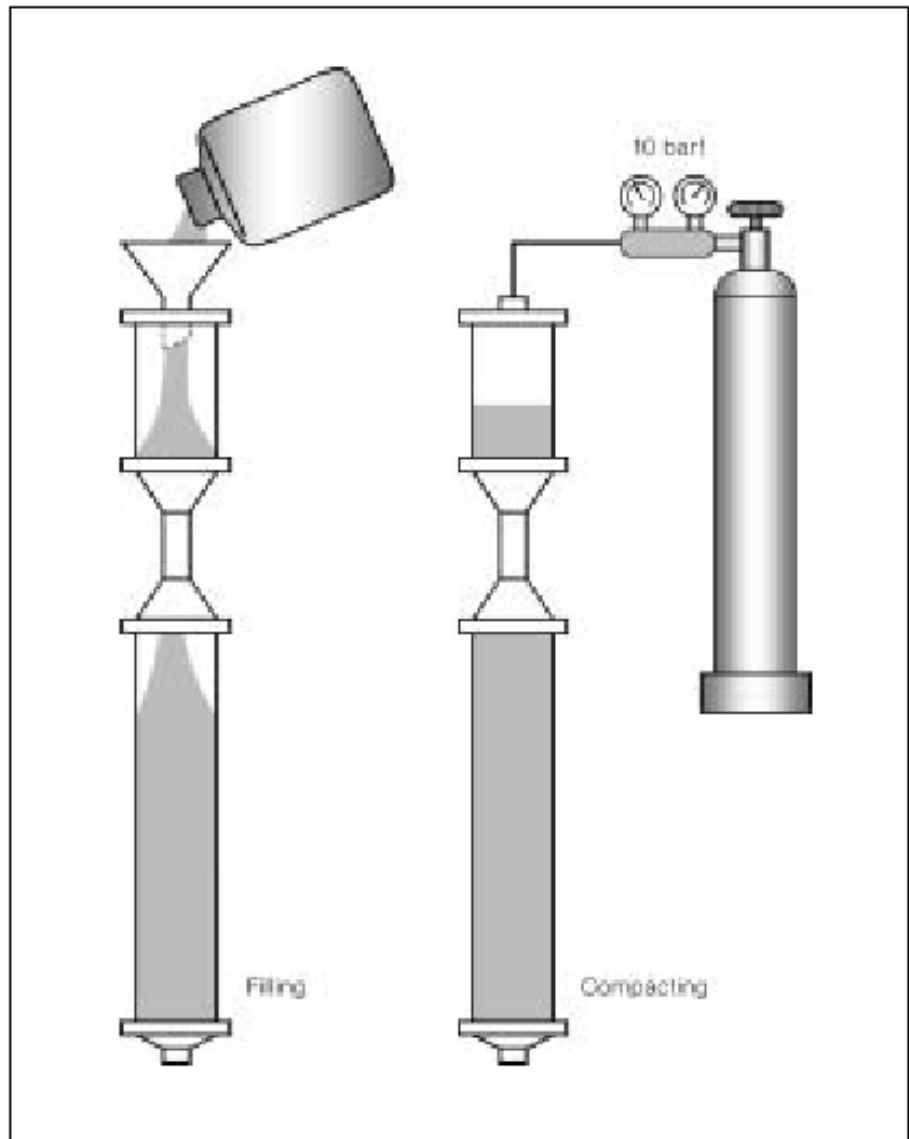
Attenzione. Effettuare sempre questa operazione interponendo uno schermo protettivo tra la colonna e l'operatore ed indossando occhiali e guanti.

Chiudere la valvola dell'azoto e lasciare che la pressione interna del cilindro si equilibri a quella esterna. Questo è indispensabile affinché il letto di adsorbente non salti al momento del distacco dalla linea di azoto.

La colonna è ora pronta per essere condizionata con il solvente.

Con un po' più di sforzo si può riempire una colonna senza il recipiente di riempimento introducendo l'adsorbente direttamente in colonna.

Figura 44:
Impaccamento della colonna
con un recipiente di
riempimento.



11.3 Impaccamento con il sistema Büchi Cartridge C-670.

Un metodo conveniente per impaccare colonne speciali e piccole colonne con vari assorbenti è il sistema Büchi Cartridge C-670. Questo permette un efficiente impacchettamento in meno di un minuto in maniera semplice e riunisce tutti gli strumenti necessari per la procedura.

Materiali:

Cartuccia o colonna da riempire

Adsorbente

Büchi Cartridge C-670

Preparazione. Per le cartucce (nuove) non è necessaria alcuna preparazione

Impaccamento:

Fluidificare la silice nell'apparecchio

Inserire il setto poroso inferiore nella cartuccia

Avvitare la cartuccia dalla parte del setto poroso nel porta cartuccia

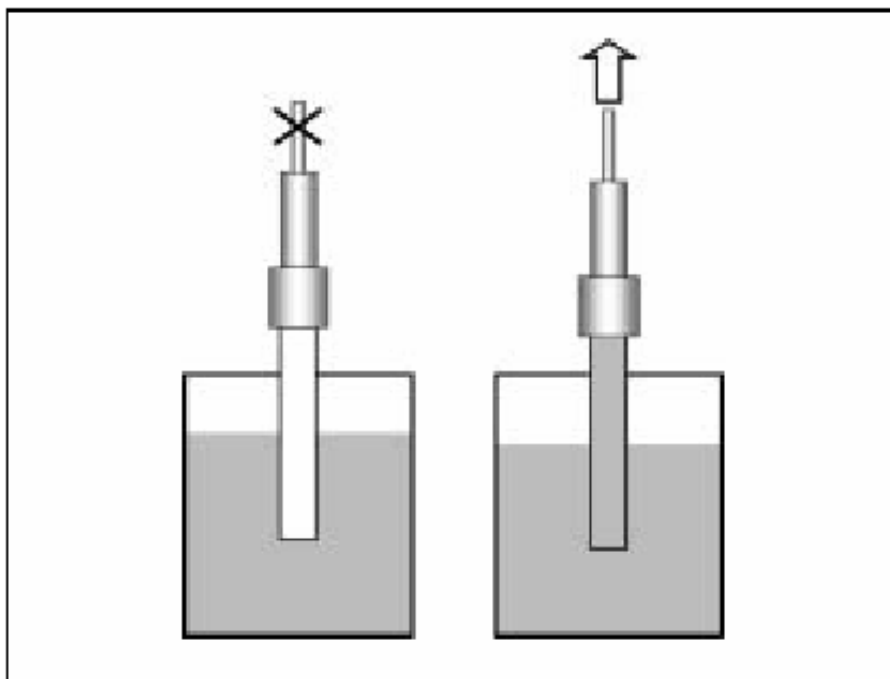
Immergere la cartuccia nella silice fluidificata (immergere circa 4-5 cm)

Aprire la valvola del vuoto

Lasciare il vuoto aperto e lasciar riempire la cartuccia col gel

Inserire il secondo setto

Chiudere la valvola del vuoto e svitare la cartuccia



11.4 Impaccamento ad umido (slurry) per la silice.

Nel metodo descritto, la silice è sospesa nella fase mobile (1 volume di silice in 2-3 volumi di solvente) e la sospensione è inserita nella colonna.

Il metodo è idoneo per gel di silice o gel RPC.

Materiale

Colonna da riempire
Recipiente per lo slurry
Adsorbente
Solvente
Imbuto (diametro massimo di uscita 9.5 cm)
Beaker

Preparazione

Lavare la colonna ed asciugarla bene
Controllare tutte le connessioni ed eventualmente restringerle

Impaccamento

Sospendere il gel di silice omogeneamente nella fase mobile
Fissare la colonna verticalmente
Aprire il recipiente di riempimento e l'eventuale rubinetto
Introdurre lo slurry
Riempire completamente la colonna con il solvente
Connettere l'ingresso della colonna alla pompa

Compattamento

Far partire la pompa con una velocità di flusso corrispondente al diametro della colonna e spingere la fase mobile 1 -2 volte il volume della colonna.
Fermare la pompa, chiudere il rubinetto e togliere il recipiente di riempimento.
La colonna è pronta all'uso.

Tabella 17:

Quantità di gel e di solvente necessari ad impaccare colonne di varie dimensioni.

Column i.x x L (mm)	Silica gel (g)	Slurrying process (ml of solvent)
26 x 460	150	300 - 600
36 x 460	270	500 - 900
49 x 460	470	800 - 1200
70 x 460	1000	2000 - 2500

Per colonne col L = 230 mm usare la metà delle quantità riportate in colonna.

11.5 Impaccamento per gel soffici e rigidi.

Non c'è un metodo ottimale per riempire una vasta gamma di materiali adsorbenti. Le caratteristiche specifiche dei gel (dimensione dei grani, stabilità alla pressione, gel semi rigidi o rigidi) non permette di usare un solo metodo per tutti i casi. E' necessario fare attenzione alle informazioni date dal produttore del gel.

Una colonna efficiente è caratterizzata da letto di assorbente omogeneo, sia rispetto alla distribuzione dei granelli che per la compressione. Inoltre in una buona colonna non si dovrebbero formare canali preferenziali per il solvente né esserci bolle di aria intrappolate all'interno.

I metodi di riempimento a secco possono essere impiegati solo con gel rigidi che non mostrano alcun tipo di rigonfiamento nel solvente (silice, allumina, vetro). In generale colonne per cromatografia gel si rieempiono con la tecnica ad umido. La procedura descritta di seguito è una delle possibili che produce colonne riempite di gel con una adeguata stabilità alla pressione.

Riempimento della colonna:

Chiudere l'uscita della colonna

Fissare la colonna verticalmente

Avvitare il recipiente del solvente con la colonna

Mettere pochi ml di solvente nella colonna ed aprire il rubinetto di uscita per permettere al solvente di riempire lo spazio di raccolta sotto il setto poroso.

Chiudere di nuovo il rubinetto.

Immettere lo slurry nella colonna

Riempire il recipiente di riempimento con il solvente e collegare la pompa

Aprire il rubinetto di uscita ed avviare la pompa. Fare attenzione alla pressione massima indicata dal produttore del gel. Appena il letto della colonna non gocciola più, la colonna è pronta.

La velocità del flusso durante l'impaccamento deve essere impostata ad un valore leggermente superiore a quello della successiva separazione. Questa procedura impedisce al letto della colonna di gocciolare, cosa che produce un volume morto all'entrata della colonna con effetti devastanti. La velocità di flusso ottimale così come la massima pressione possibile possono essere richieste al produttore del gel.

Rigonfiamento del gel.

I gel disponibili commercialmente in forma secca devono essere prima fatti rigonfiare. E' indispensabile che il rigonfiamento sia completato prima di introdurre il gel nella colonna.

Se il gel viene introdotto troppo presto, questi continuerà a rigonfiarsi nella colonna e la pressione risultante distruggerà la struttura omogenea del gel rendendo instabile la colonna. I volumi ed i tempi di rigonfiamento sono riportati in Tabella 18 e sono riferiti come esempio al gel Sephadex G.

Tabella 18:
 Tempi e volumi di
 rigonfiamento riferiti al
 Sephadex G.

Gel	Bed volume (ml/g dry gel)	Swelling time at 20°C (h)
G-10	2 – 3	3
G-15	2.5 – 3.5	3
G-25	4 – 6	3
G-50	9 – 11	3
G-75	12 – 15	24
G-100	15 – 20	72
G-150	20 – 30	72
G-200	30 – 40	72

Preparazione dello slurry.

Pesare la quantità di gel richiesto con un 5-10% di eccesso in un beaker di dimensioni adeguate (occhio al fattore di rigonfiamento). Meglio beaker larghi e bassi.

Aggiungere un flusso continuo di solvente fino a che il gel è ben coperto dal solvente. Il rigonfiamento inizia subito.

Agitare dolcemente lo slurry con una bacchetta di vetro. Non usare agitatori magnetici o meccanici che possono degradare il gel.

Lasciar rigonfiare completamente il gel.

Il solvente sopra il gel può essere opaco a causa della presenza di particelle fini di gel che andrebbero separate per decantazione.

Aggiustare la concentrazione dello slurry così da ottenere un volume di gel pronto di circa il 75% del volume totale.

Lavorando con gel già rigonfiati, è necessario solo aggiungere solvente per raggiungere il volume del 75% del totale.

Cambio del solvente da A a B.

Un largo numero di gel sono disponibili per l'uso in fase acquosa od organica. C'è da notare che il rigonfiamento dello stesso gel in solventi diversi può variare notevolmente. Non si dovrebbe pertanto variare il solvente nella colonna. Lo stesso dicasi per il gel già rigonfiati in acqua che si vogliono utilizzare nelle colonne con solventi organici. La tabella seguente illustra queste differenze nel rigonfiamento prendendo come esempio due tipi diversi di gel.

Tabella 19:
Differenze di rigonfiamento
tra solventi.

Solvent	Swelling factor			
	Sephadex LH-20	LH-60	Fraktogel HW-40	HW-75
Water	1.00	1.00	1.00	1.00
Acetone	0.60	0.45	0.80	0.10
Chloroform	0.93	0.99		
Dichloromethane	0.93	0.88		
Dimethylformamide	1.00	1.04	1.10	1.20
Dimethyl sulfoxid	1.07	1.08		
Ethanol	0.89	0.96	1.00	1.10
Methanol	0.98	0.96	1.00	0.65
Tetrahydrofuran	0.82	0.77		
Toluene			1.05	0.90

Cambio di solvente da A a B:

Mettere la quantità di gel richiesto (nella forma secca) in un imbuto filtrante a setto poroso sotto vuoto.

Disperdere il gel in una miscela di solvente costituita dal 70% di A ed il 30 % di B. Filtrare e ripetere la procedura. Disperdere il il gel in una miscela di solvente consistente nel 30% di A e 70% di B, filtrare a secco e ripetere la procedura. Disperdere il filtrato in tutto B, filtrare e ripetere la procedura. Adesso il gel è pronto per farci lo slurry per il riempimento con il nuovo solvente.

11.6 Condizionamento di colonne pre-impaccate.

Il condizionamento di colonne pre-impaccate non comporta particolari problemi. Come regola, il condizionamento è condotto direttamente nella fase mobile necessaria per la separazione. E' però necessario eliminare i primi 100-200 ml di liquido dalla colonna nuova e solo dopo iniziare a riciclare il solvente. Questa precauzione impedisce che piccole particelle di silice possano essere dilavate dalla colonna ed entrando nelle pompe possano fare danni. Appena non esce più l'aria contenuta nella colonna e la linea di base del detector è stabile, si può iniziare la separazione.

Se l'operazione che stiamo compiendo non è l'inizializzazione di una nuova colonna ma un cambio di solvente, è necessario che il solvente precedentemente contenuto nella colonna sia stato completamente sostituito dal nuovo e questo avviene dopo aver eluito almeno 2-3 volte il volume totale della colonna.

11.7 Condizionamento di colonne riempite ad umido.

Le colonne riempite col metodo dello "slurry" non richiedono alcun condizionamento aggiuntivo e possono essere usate immediatamente dopo che almeno 1-2 volumi di colonna sono stati eluiti.

11.8 Condizionamento di colonne gel.

Le colonne di gel impaccate sono pronte per l'uso e non richiedono condizionamento.

12 Test per le colonne.

12.1 Aspetti generali

Nel caso di colonne riempite in laboratorio è essenziale conoscere le loro caratteristiche in quanto, anche se si sono seguite perfettamente tutte le raccomandazioni, un impaccamento difettoso può sempre avvenire. Un test è quindi consigliabile specialmente quando si sta iniziando ad usare le tecniche di impaccamento delle colonne e non si è acquisita sufficiente esperienza. Il test permette anche di acquisire moltissime informazioni con poca fatica e questo può essere utilissimo nelle successive separazioni di miscele incognite.

Inoltre, colonne male impaccate possono essere subito eliminate ed impaccate di nuovo senza troppe perdite di tempo e prodotti.

Una buona colonna si può infatti usare per più separazioni e quindi un test può anche servire per stabilire il livello di qualità di una colonna dopo un certo tempo di servizio oppure dopo un lungo periodo di inattività. Spesso infatti una colonna può apparire difettosa dopo poche separazioni ma avere sempre la capacità di dare buone separazioni senza effetti avversi. Un buon test può, in questi casi, impedire di riempire nuovamente la colonna con indubbio risparmio di lavoro.

Come si controlla una colonna? In pratica si può usare una qualsiasi sostanza pura come standard in funzione del tipo di riempimento usato nella colonna. La sostanza deve essere facilmente evidenziabile dal detector se non addirittura colorata. Il test dovrebbe poi essere condotto con lo stesso tipo di eluente con cui si effettuerà la successiva separazione.

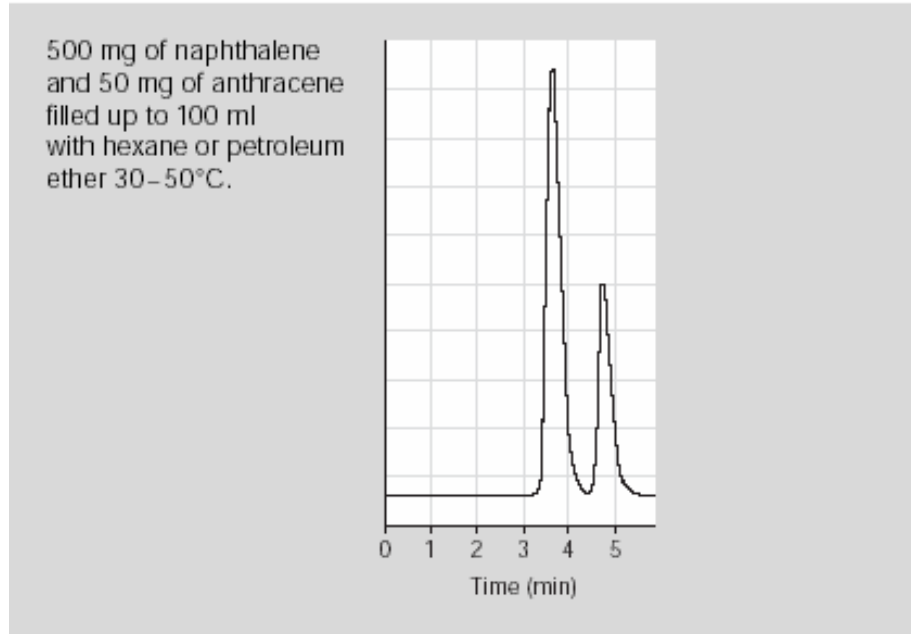
Per le colonne analitiche, la qualità della colonna può essere determinata calcolando il numero dei piatti teorici. La stessa cosa può anche essere fatta con le colonne preparative anche se spesso, una colonna con un basso numero di piatti teorici realizza separazioni egregie in quanto sovraccaricata. Un altro possibile test si può effettuare usando una miscela di prodotti di riferimento sempre riferibili alle miscele che poi dovranno essere separate con la colonna. Anche questo test permette di acquisire informazioni sulla qualità del materiale di impaccamento e necessita di poca fatica. Una breve lista di miscele di controllo sono riportate nella sezione successiva. Ovviamente è possibile usare moltissime altre miscele badando sempre alla relazioni con i prodotti che si vogliono separare. Non esiste infatti una miscela universale.

12.2 Miscele test

12.2.1 Miscele test per colonne in fase normale.

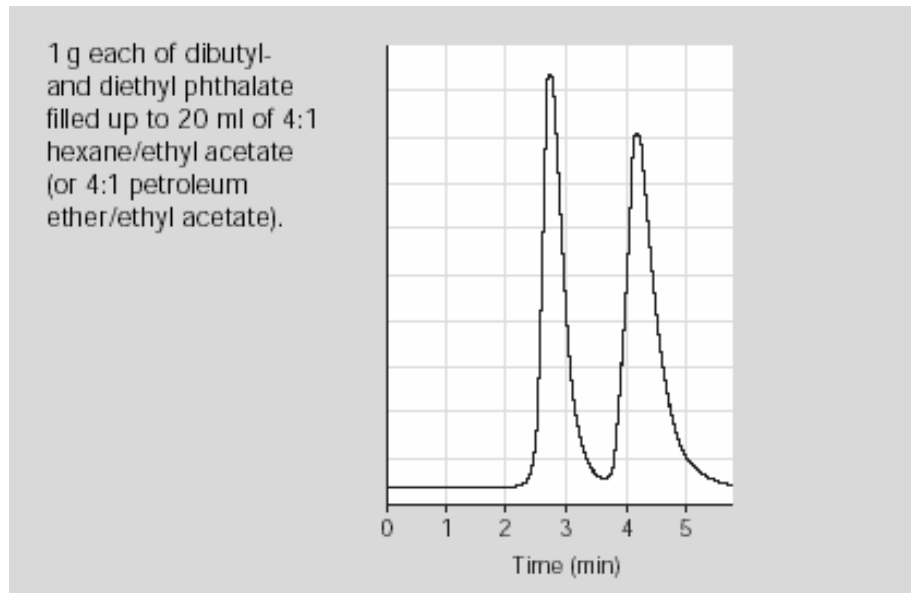
a) *Naftalene/ antracene*

Figura 46:
Cromatogramma di controllo
di una miscela naftalene/
antracene.



b) *Dibutilftalato / dietilftalato*

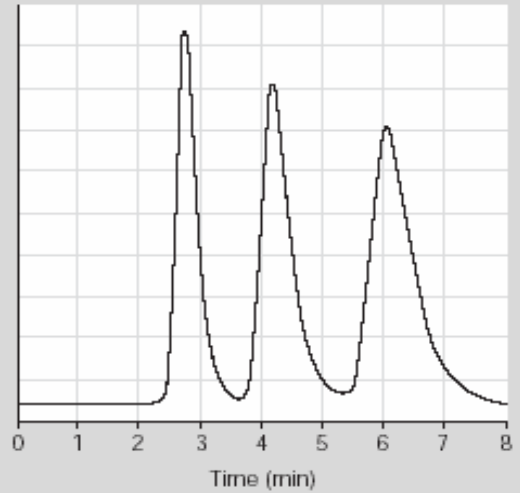
Figura 47:
Cromatogramma di controllo
di una miscela dibutil-/dietil-
ftalato



c) *dibutil/ dietil e dimetil ftalati*

Figura 48:
Cromatogramma di controllo di una miscela dibutil- / dietil- e dimetil-ftalati

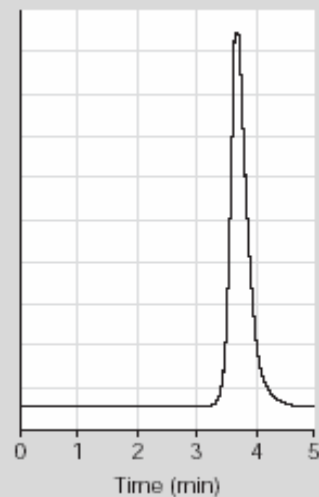
1 g each of dibutyl- and diethyl phthalate filled up to 20 ml of 4:1 hexane/ethyl acetate (or 4:1 petroleum ether/ethyl acetate).



d) *Naftaline*

Figura 49:
Cromatogramma di controllo con naftalene

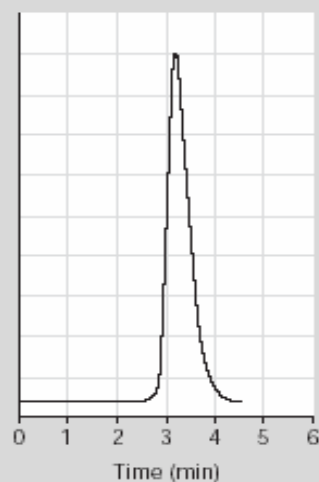
500 mg of naphthalene filled up to 100 ml with hexane.



e) *Nitrobenzene*

Figura 50:
Cromatogramma di controllo con nitrobenzene

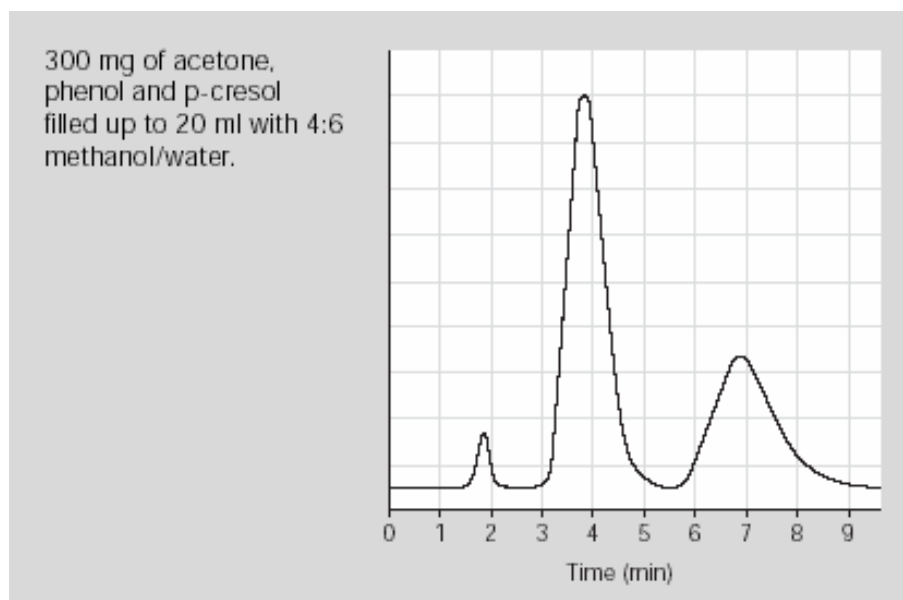
1 ml of nitrobenzene filled up to 100 ml with 95:5 hexane/ethyl acetate.



12.2.2 Miscele test per colonne in fase inversa.

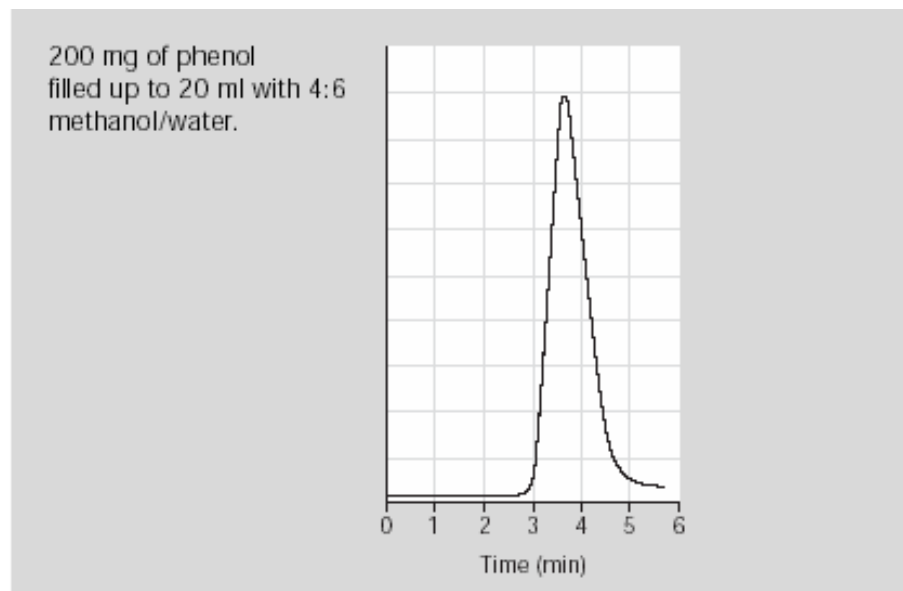
a) Acetone, fenolo, e p-cresolo

Figura 51:
Cromatogramma di controllo di una miscela acetone, fenolo, p-cresolo



b) Fenolo

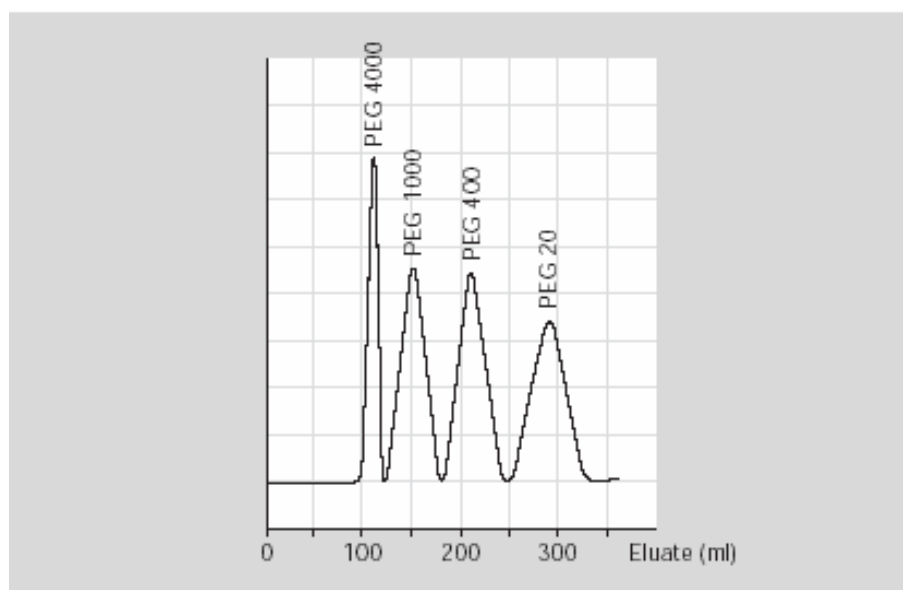
Figura 52:
Cromatogramma di controllo con fenolo



12.2.3 Miscele test per gel ad esclusione dimensionale.

Un eccellente test per colonne GFC è il “Blue Dextran 2000” (Pharmacia) un polisaccaride di sintesi con peso molecolare di circa $2 \cdot 10^6$. A causa di questo peso molecolare così elevato è indicato per determinare il volume intermedio dei grani VZ (volume di esclusione completa). Il “Blue Dextran 2000” si scioglie perfettamente in acqua e sale ed è usato come lo 0.2% del solvente.

Figura 53:
Cromatogramma di
controllo con PEG



12.2.4 Esempi di cromatogrammi di controllo

I cromatogrammi successivi mostrano i risultati che possono essere ottenuti con i metodi di riempimento qui descritti. Mostrano anche che una colonna che non opera in condizioni ottimali rispetto ad una colonna analitica per HPLC, è ugualmente adatta per una cromatografia preparativa.

Una colonna preparativa si degrada più rapidamente di una analitica e pertanto il materiale di impaccamento deve essere sostituito più frequentemente. È importante che la nuova colonna possa essere impaccata con poca fatica. Si potrebbe pensare di seguire il seguente principio: la colonna da usare deve essere idonea per la sua funzione anche se non così buona come potrebbe essere. Le condizioni ottimali sono raramente rispettate durante una separazione preparativa proprio a causa del sovraccarico delle colonne. Questo fatto deve essere sempre ricordato quando si considerano le specifiche delle colonne.

13 Pulizia delle colonne.

Una colonna preparativa può essere usata più volte anche per separazioni diverse. È quindi importante lavare via bene tutti i prodotti che potrebbero rimanere in colonna dopo una separazione contaminando la fase stazionaria.

Le colonne dovrebbero essere lavate bene con metanolo e poi chiuse alle estremità. Possono essere così tenute in magazzino al riparo dalla luce e dal calore fino a che non servano di nuovo. Prima di una nuova utilizzazione è però preferibile fare un nuovo lavaggio. I gel in fase acquosa sono sensibili alla proliferazione di microrganismi e quindi devono essere mantenute in maniera idonea specialmente se per lunghi periodi di inattività.

- a) Con aggiunta di agenti antibatterici nell'eluento.
- b) proteggendo la colonna con antibatterici durante il periodo di inattività

Gli agenti antibatterici possono essere usati direttamente nell'eluento solo se non reagiscono con il gel e non comportano ulteriori lavorazioni durante la raccolta delle frazioni. Nel caso di rischi di questo genere si può usare solo il secondo metodo, nel qual caso la sostanza antibatterica deve essere eliminata bene dalla colonna prima di iniziare. Antibatterici idonei possono essere, tra gli altri: sodio azide (0.05% in acqua), cloroetone (o 1,1,1-trimetil-2-metil propanolo, 0.0005% in acqua). Le colonne conservate così devono essere chiuse ermeticamente e protette dalla luce del sole e da altre fonti di calore.

13.1 Pulizia di colonne in fase normale

Si raccomanda di lavare bene la colonna con metanolo alla fine del processo di separazione cromatografico. Se si presume vi siano impurezze di tipo alcalino (poliammine o altro) si può lavare con una soluzione di acido acetico al 5% in metanolo. La colonna può poi essere ricondizionata come segue:

acqua (se si è usato l'acido acetico)
metanolo
diclorometano
la fase mobile da utilizzare

La silice è un fortissimo assorbente, specie da secca, e quindi può assorbire impurezze anche dall'ambiente nel quale viene mantenuta (olio, fumi, vapori di prodotti chimici) che possono poi riapparire come frazioni durante la separazione.

13.2 Pulizia di colonne in fase inversa

L'efficacia di una colonna a fase inversa diminuisce progressivamente con il numero di utilizzazioni perché lavandola con solventi organici modifica la superficie adsorbente.

Si raccomanda la seguente serie di solventi per la pulizia di una colonna a fase inversa

metanolo

diclorometano

metanolo

la fase mobile da utilizzare

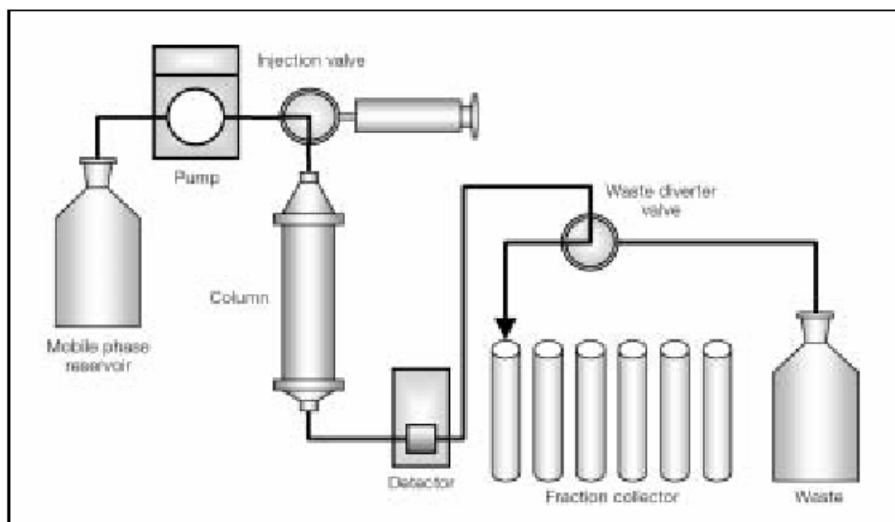
13.3 Pulizia di colonne gel

Nel caso di purificazione di proteine per filtrazione su colonne di gel, la colonna deve essere prima lavata in condizioni di denaturazione della proteina (4 M di urea in acqua) per rendere più facile il successivo lavaggio.

14 Descrizione dell'equipaggiamento

Un cromatografo liquido preparativo è rappresentato nello schema seguente (Figura 54)

Figura 54:
Apparecchio LC



L'apparecchio comprende una riserva di fase mobile, una pompa per spingere la fase mobile nel sistema, un sistema di iniezione per caricare il campione da separare, la colonna dove avviene la separazione, un detector connesso all'uscita ed un registratore che misura la variazione di composizione dell'eluato ed infine un raccogliatore di frazioni che permette di separare frazioni con diversa composizione dell'eluato.

Riserva di fase mobile.

Il materiale assorbente non dovrebbe mai rimanere a secco. Il cromatografo deve quindi avere una riserva di solvente sufficientemente grande da impedire l'essiccamento della colonna per tutto il periodo della separazione. I sistemi moderni permettono anche la possibilità di mescolare la fase mobile in linea realizzando un miscelamento continuo ed una eluizione in gradiente. Per questo è necessario avere recipienti diversi per i vari componenti dell'eluente.

Pompe

Per realizzare un flusso costante di eluente nella colonna è necessaria una pompa di potenza sufficiente per vincere la contropressione esercitata dalla colonna e quindi garantire una efficienza sufficiente.

Iniezione

Il sistema di iniezione è importantissimo per realizzare un rilascio omogeneo del campione nella colonna e deve realizzare l'inserimento in linea senza far entrare aria nella colonna oramai equilibrata. L'iniezione deve avvenire nella maniera più diretta possibile per impedire un mescolamento con la fase mobile. In tal modo i componenti della miscela si potranno muovere come bande nette all'interno della colonna.

Colonna

La colonna è il luogo dove avviene la separazione. Le sue pareti devono resistere alla pressione generata dalla pompa e dall'impaccamento della colonna stessa. L'impaccamento è la parte più critica della colonna e la sua scelta è guidata dalle specifiche esigenze della separazione cromatografica.

Detector

Il detector permette di valutare il profilo di separazione e segnalare quando variare i contenitori del raccoglitore di frazioni sulla base della composizione del campione.

Il detector più comune è basato sulla spettroscopia UV, vi sono poi anche esempi di detector ad indice di rifrazione o a conduttività elettrica del mezzo eluente. Il detector è in genere associato ad un registratore che permette di produrre un cromatogramma che si utilizza come riferimento.

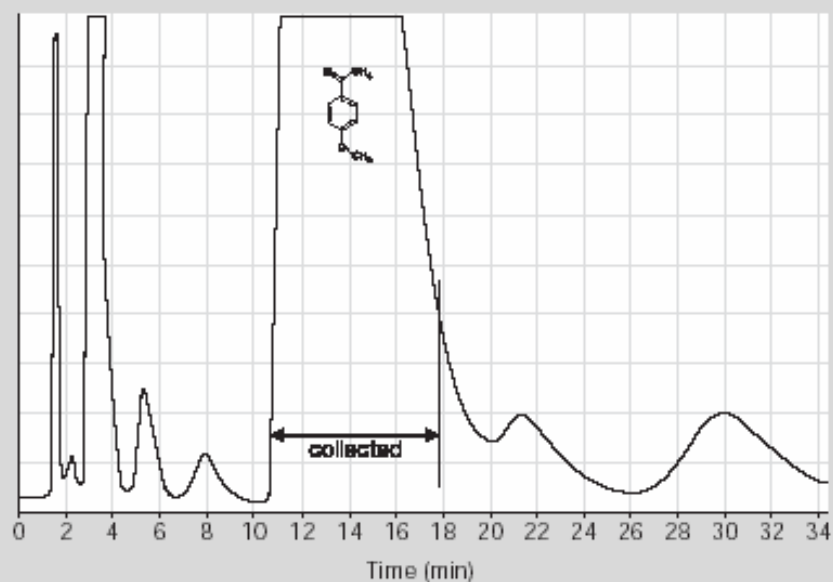
Collettore di frazioni

Il collettore di frazioni permette di separare il materiale basandosi sulla variazione delle proprietà della miscela eluente determinate dal detector. Il cambio di frazione può essere programmato in funzione del volume di eluente oppure correlato automaticamente ad una variazione di segnale da parte del detector.

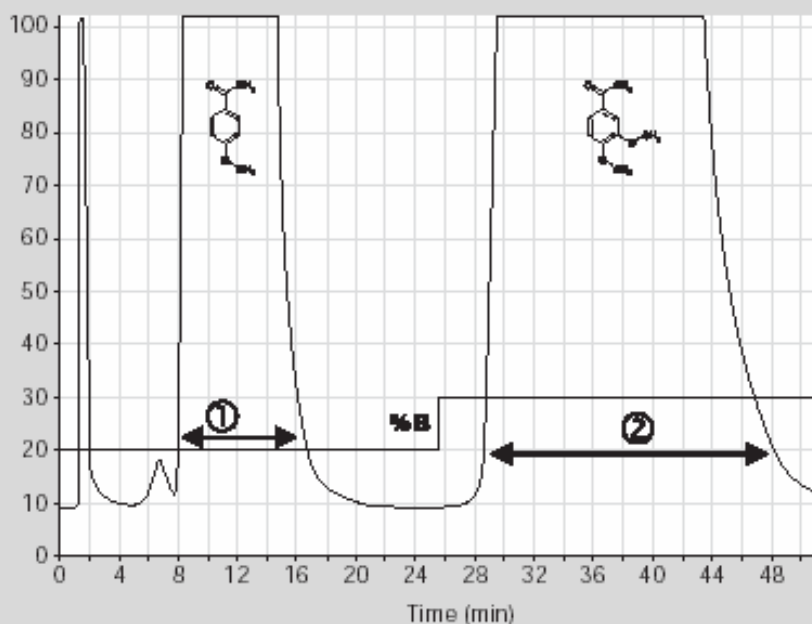
15. Esempi

Le separazioni riportate di seguito sono esempi di separazioni preparative. Sono state scelte per dimostrare l'efficacia della tecnica preparativa usando colonne o cartucce impaccate dagli utilizzatori.

Figura 55:
Esempi di separazioni
preparative



A: Cartridge 40x150 mm, packed with silica gel Si60, 40–63 μm .
Eluent = Hexane/ethyl acetat 7:3, 100 ml/min.
Loading 1.15 g dark brown oil, dissolved in 0.5 ml toluene.
Recovery of 4-Methoxy-acetophenone = 0.6 g white, crystalline product,
mp = 38.5°C.



B: Cartridge 12x150 mm, packed with silica gel Si60, 40–63 μm .
Eluent = Hexane/diisopropyl ether 8:2 and 7:3, 10 ml/min.
Loading 0.92 g mixture, dissolved in .05 ml toluene.
Recovery: 1 = 0.45 g white crystalline product, 2 = 0.28 g colorless, viscous oil.