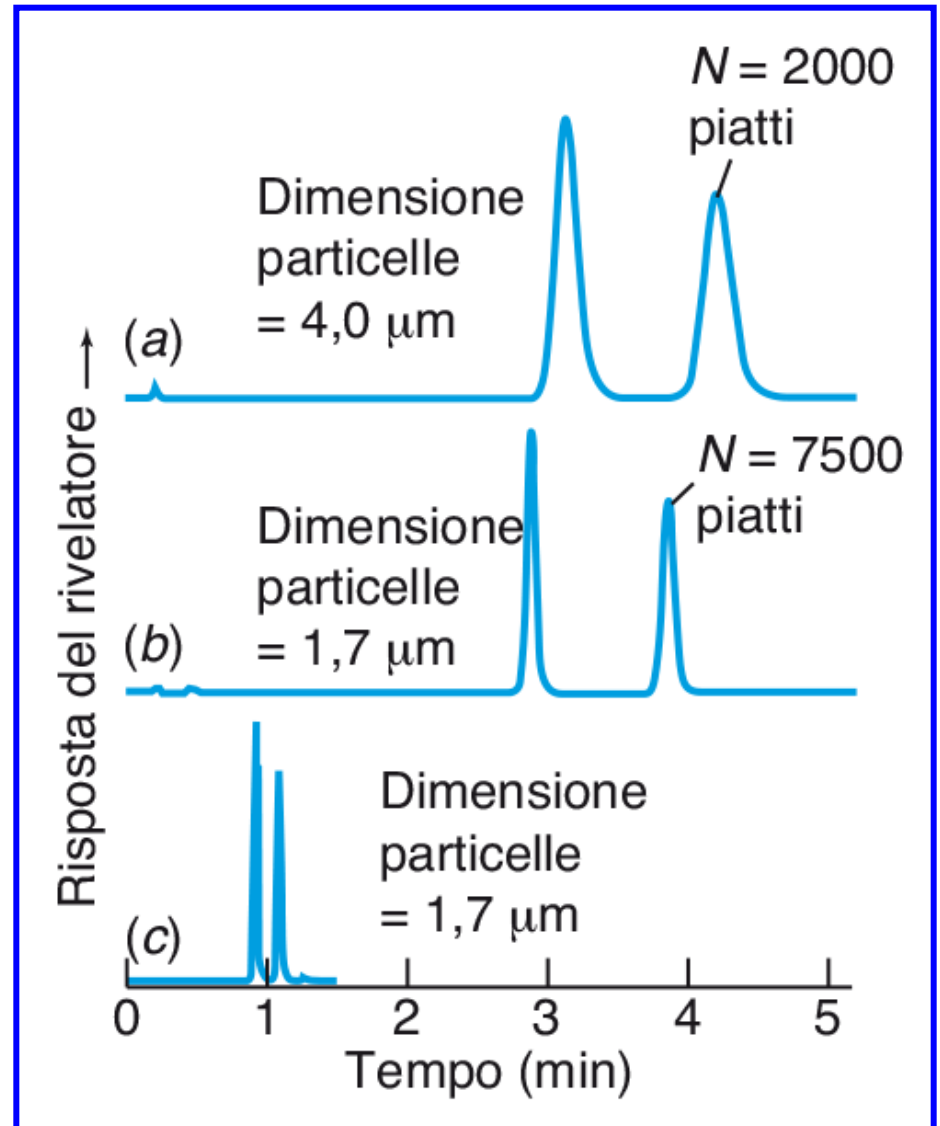


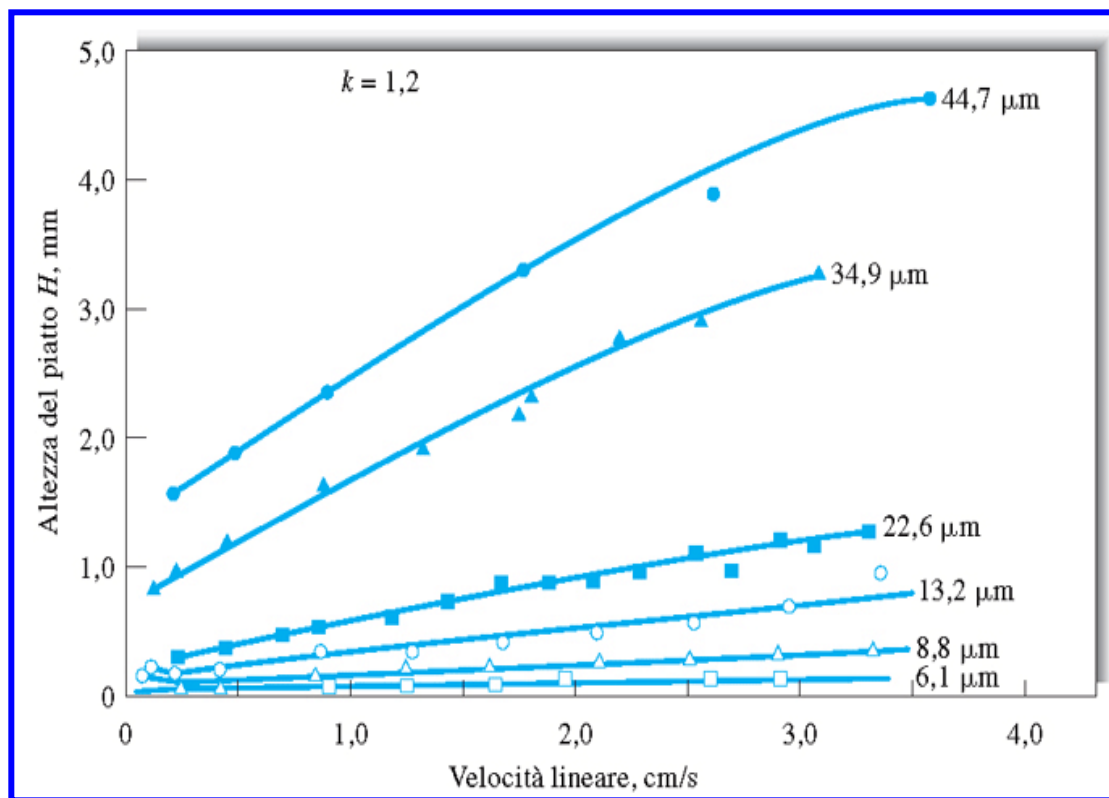
Cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC)

L'Equazione di Van Deemter suggerisce che un notevole miglioramento dell'efficienza separativa possa derivare dalla riduzione del diametro delle particelle dell'impaccamento, che abbatta il contributo del trasferimento di analita all'interno della fase mobile:

$$C_M u = \frac{f(d_P^2, d_C^2, u)}{D_M} u$$

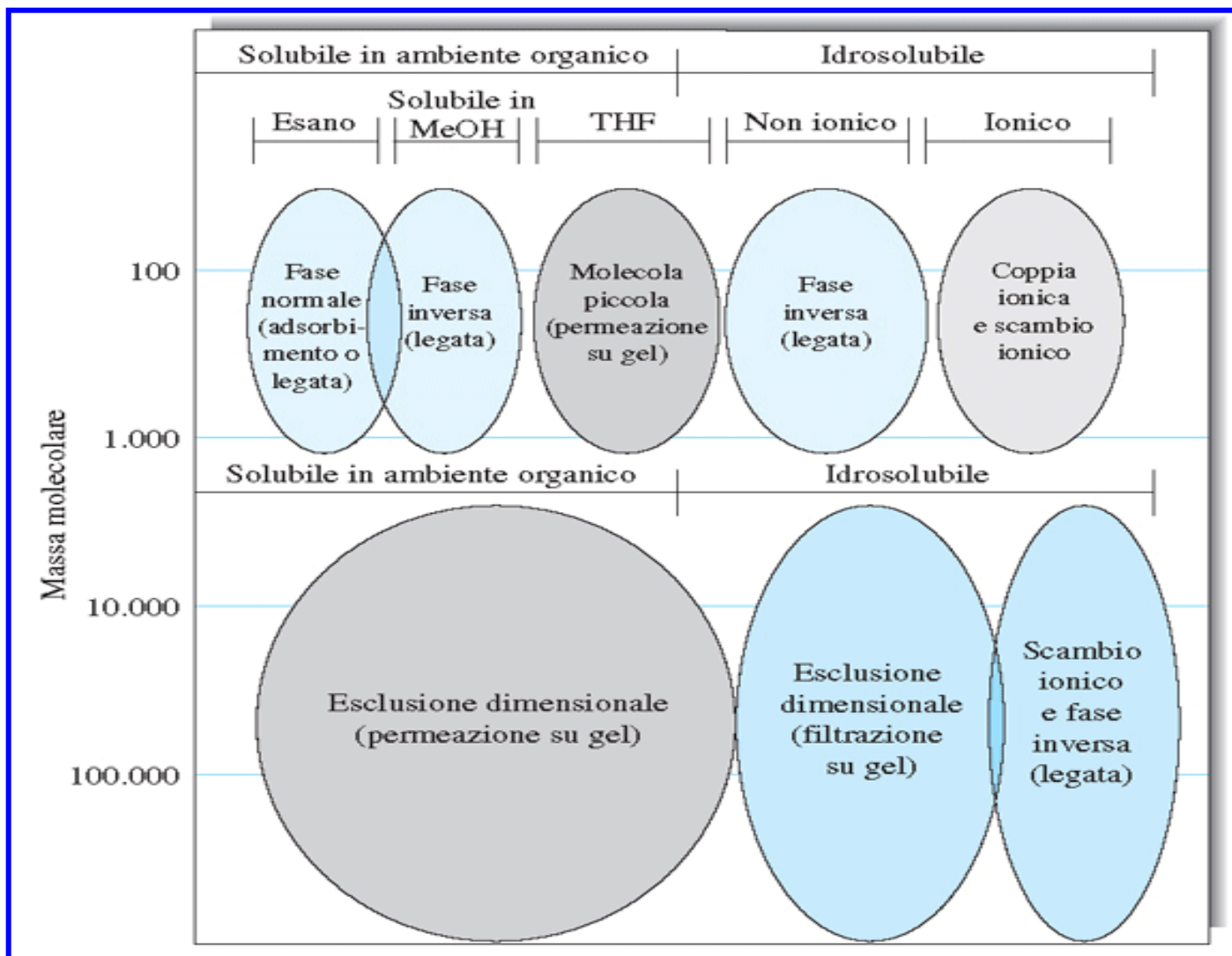


In generale la diminuzione del diametro delle particelle migliora l'altezza di piatto teorico su un grande intervallo di velocità lineari:

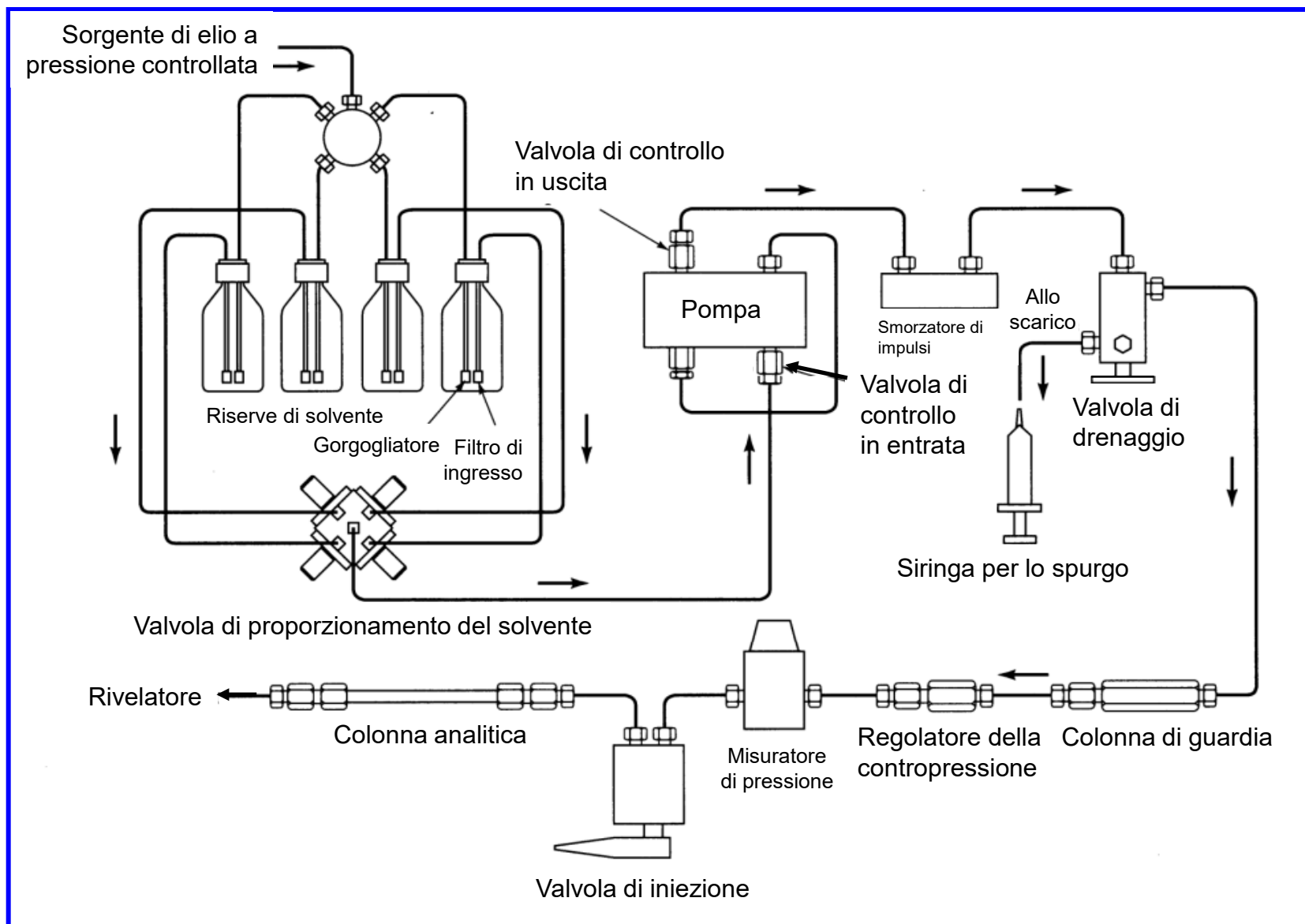


I diametri impiegati attualmente per le particelle degli impaccamenti sono di 2-5 μm e generano contro-pressioni dell'ordine di alcune centinaia di atmosfere, che possono essere vinte impiegando pompe ad alta pressione per spingere la fase mobile all'interno delle colonne.

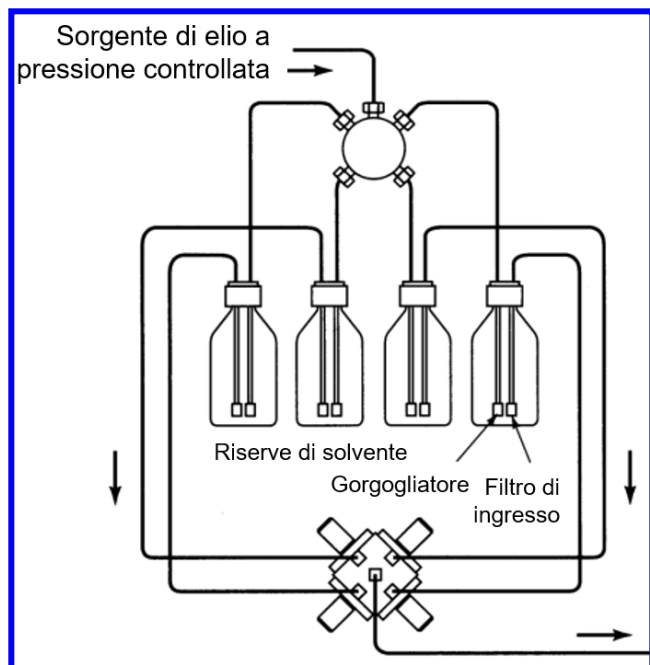
Classificazione delle tecniche HPLC



Schema generale della strumentazione HPLC

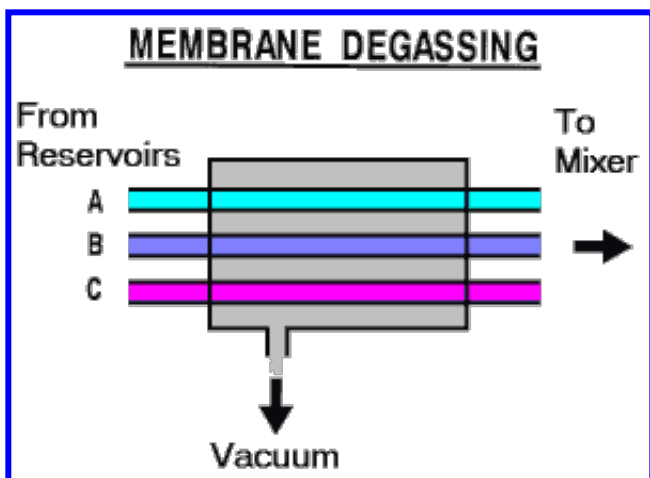


Degassatori per la fase mobile HPLC



Prima di essere aspirate nelle pompe HPLC le fasi mobili devono essere accuratamente private dell'ossigeno disciolto, per evitare la successiva formazione di bolle.

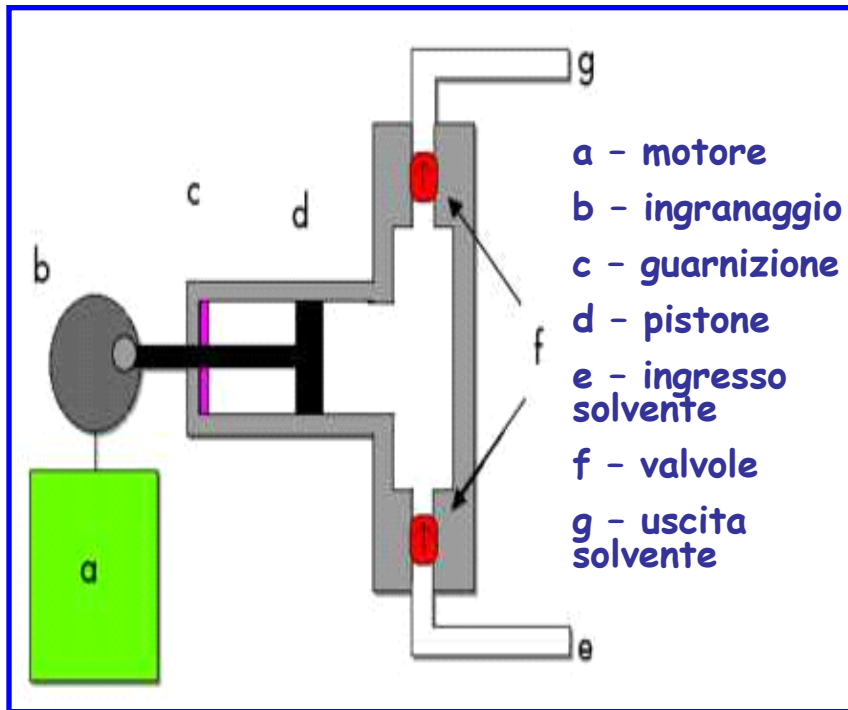
L'operazione può essere effettuata insufflando elio nei contenitori dei solventi attraverso setti porosi in acciaio.



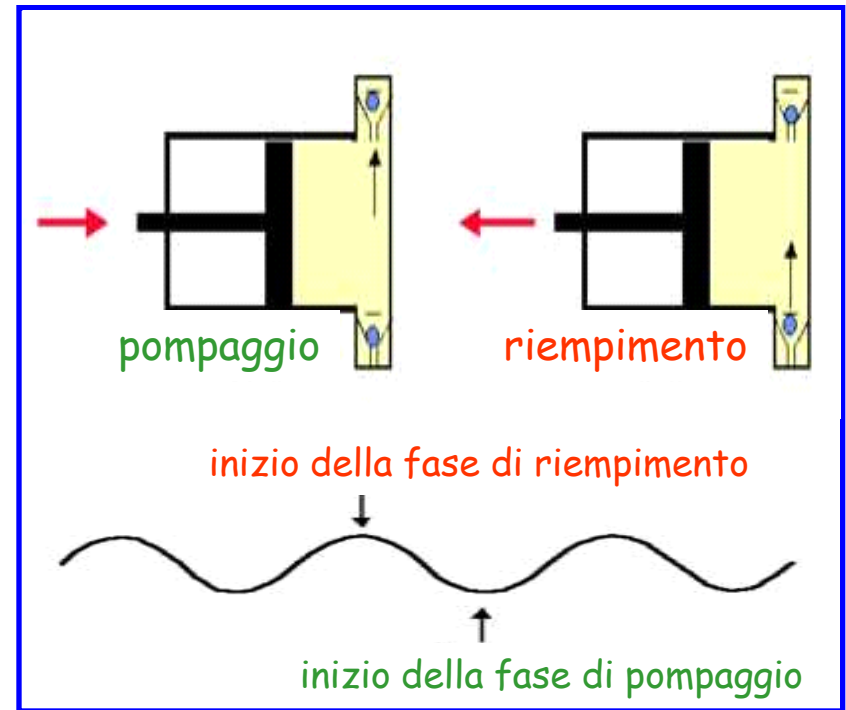
L'approccio attualmente più usato per il degassaggio è l'uso di camere sotto vuoto in cui i solventi vengono fatti passare sfruttando tubi speciali permeabili ai gas. I gas disciolti nei solventi vengono liberati per effetto della depressione esterna, permeano attraverso le pareti dei tubi e poi sono pompate all'esterno del degassatore.

Sistemi di pompaggio: pompe a pistone reciprocante

Consentono il raggiungimento di pressioni di liquido molto elevate (fino a **1000 atmosfere**), generando tuttavia un **flusso ad impulsi**:

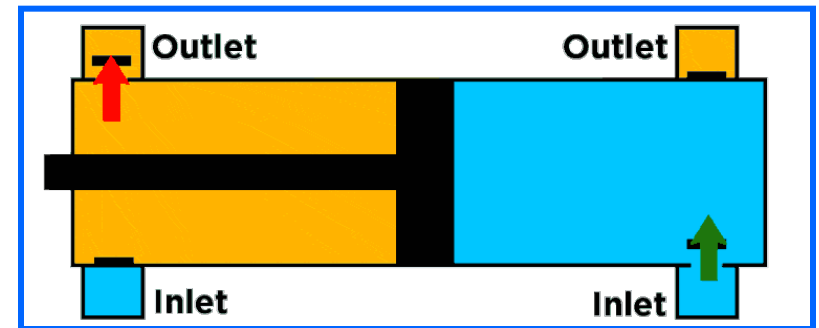
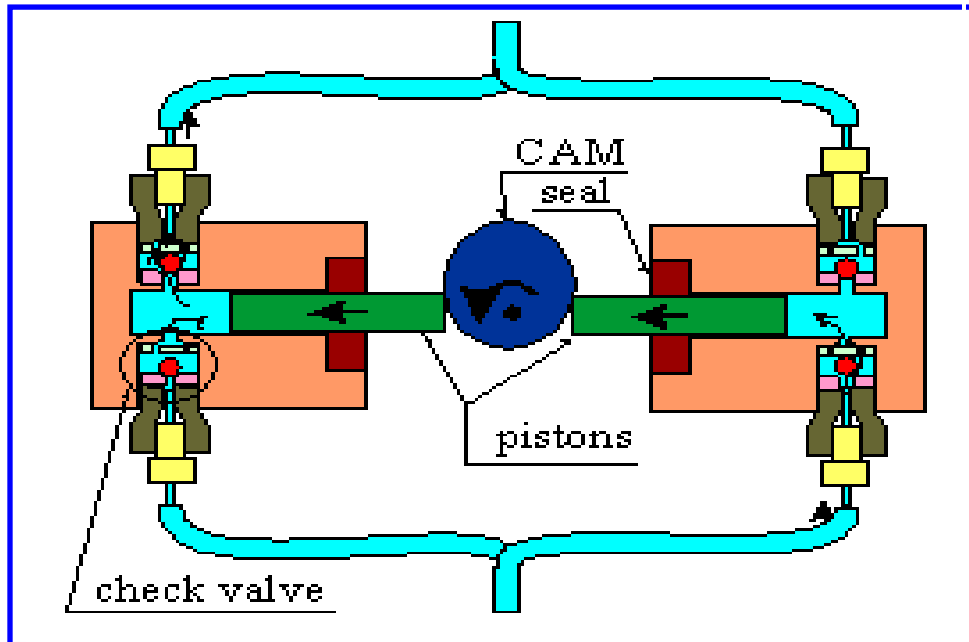


Schema in sezione

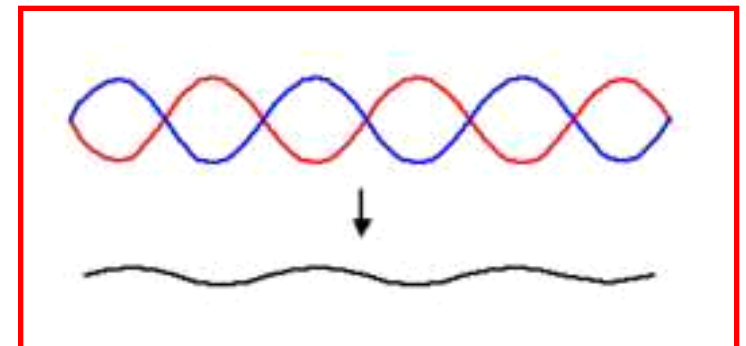


Principio di funzionamento

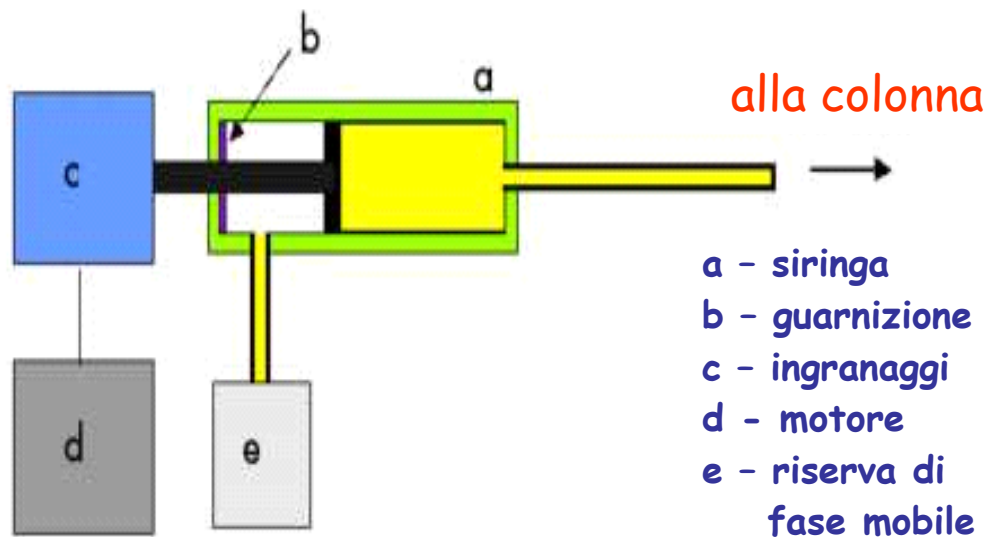
Le pulsazioni possono essere attenuate adoperando una **pompa a doppio pistone reciprocante** o a pistone singolo configurato come mostrato nell'animazione a destra:



Mentre una delle due pompe è in fase di spinta (tracciato **blu**) l'altra è in fase di aspirazione (tracciato **rosso**). Il flusso finale risulta dalla composizione dei due flussi.



Sistemi di pompaggio: pompe a siringa (o a spostamento)

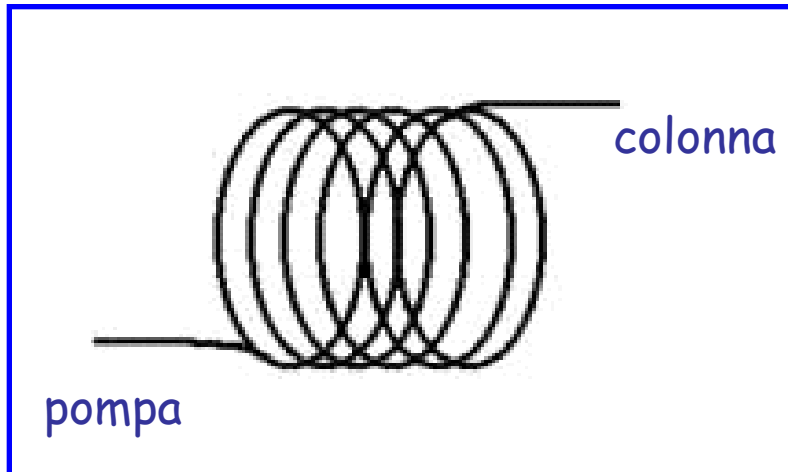


Rispetto alle pompe reciprocanti quelle a siringa hanno il vantaggio di generare un **flusso privo di impulsi** e di richiedere una **minore manutenzione**, tuttavia la presenza di una **riserva limitata di solvente** limita il tempo di impiego, essendo necessario riempire nuovamente la siringa dopo lo svuotamento.

Le pressioni massime esercitabili sono dell'ordine di **5000 atm**.

Smorzatori di impulsi

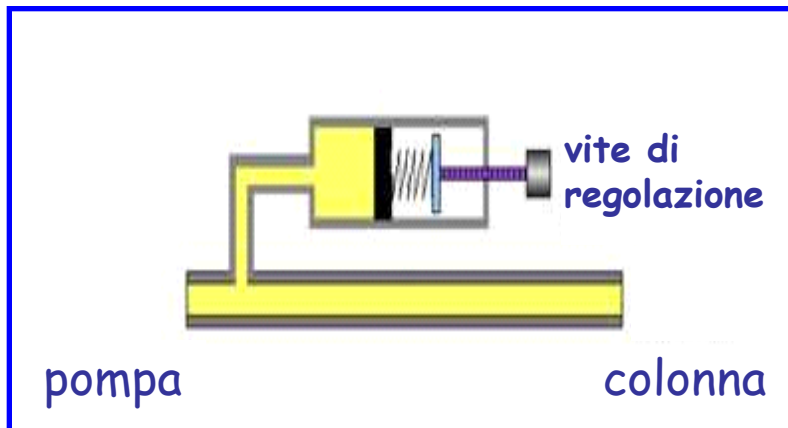
Per ridurre le pulsazioni del flusso si può introdurre uno **smorzatore di impulsi** a valle della pompa.



Lo smorzamento può avvenire interponendo un **tubo metallico flessibile, avvolto a spirale**, fra la pompa e la colonna.

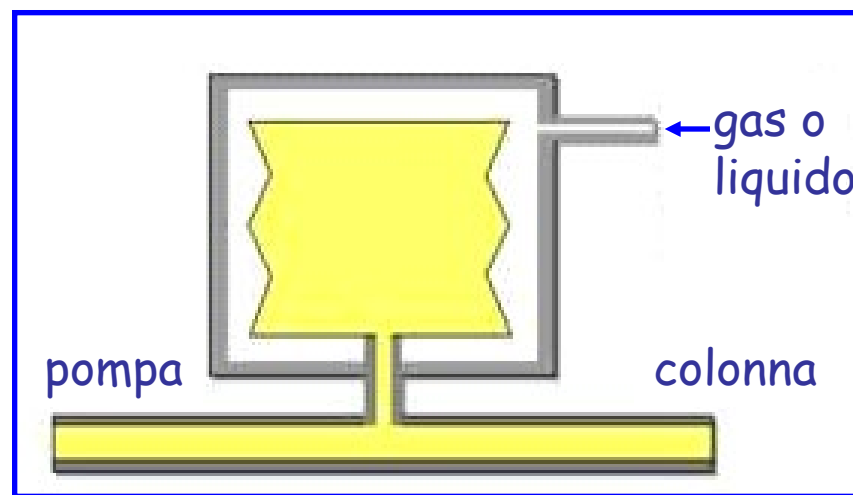
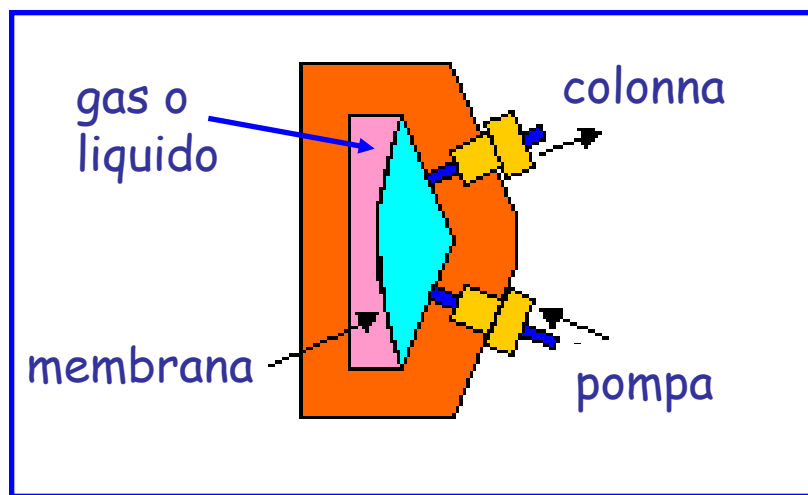
Nella fase di compressione il tubo si deforma aumentando il suo volume interno e compensando così l'aumento di pressione del liquido.

Nella fase di aspirazione il diametro del tubo si restringe ed il liquido liberato dal suo interno compensa la diminuzione di pressione.



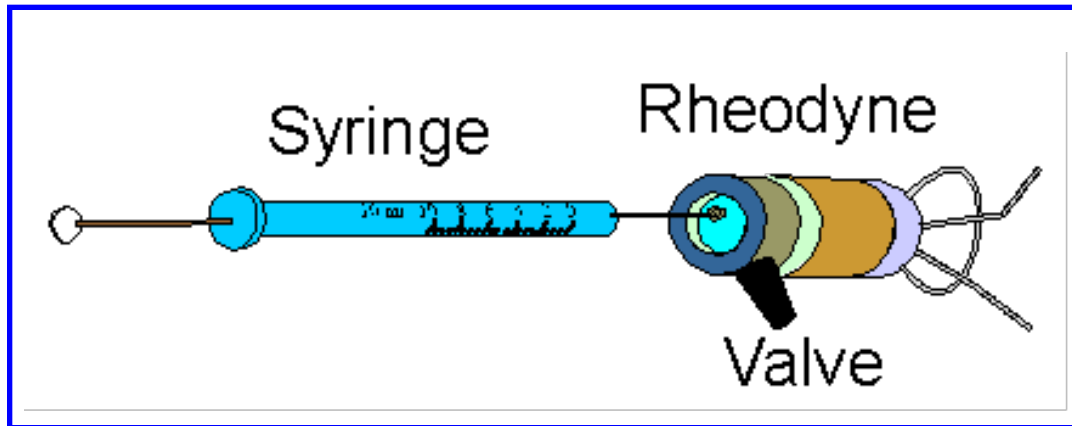
In alternativa si può usare un **dispositivo a molla regolabile**.

In altri smorzatori la compensazione delle fluttuazioni di pressione avviene ad opera di un gas o un liquido separato dalla fase mobile mediante una membrana deformabile o un mantice:

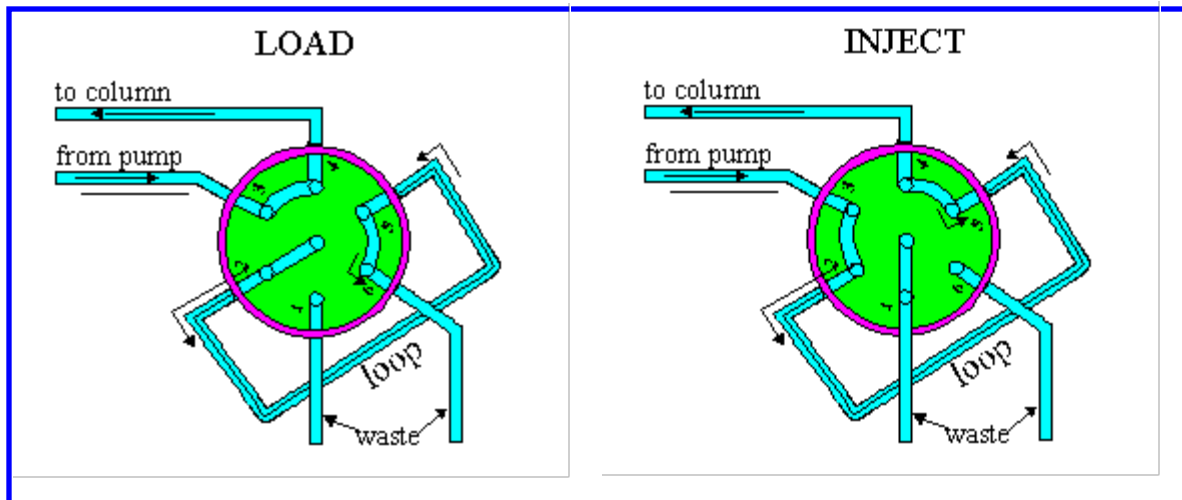


In questo caso e nei dispositivi a molla le fluttuazioni di pressione sono inferiori allo 0.1 %, notevolmente migliori di quelle ottenibili con i tubi flessibili (3 %), inoltre la fase mobile non deve passare attraverso un tubo metallico, con possibili rischi di contaminazione.

Iniettori per sistemi HPLC



Consentono l'introduzione di piccoli volumi del campione (**10-100 μL**) nel flusso di fase mobile sotto pressione con variazioni inferiori all'1%.



Principio di funzionamento

LOAD: caricamento del loop con la soluzione contenente l'analita

INJECT: iniezione del campione nel flusso di fase mobile

Dettaglio delle connessioni fra le linee esterne (o l'ago della siringa) e le cavità interne della valvola di iniezione a sei vie:

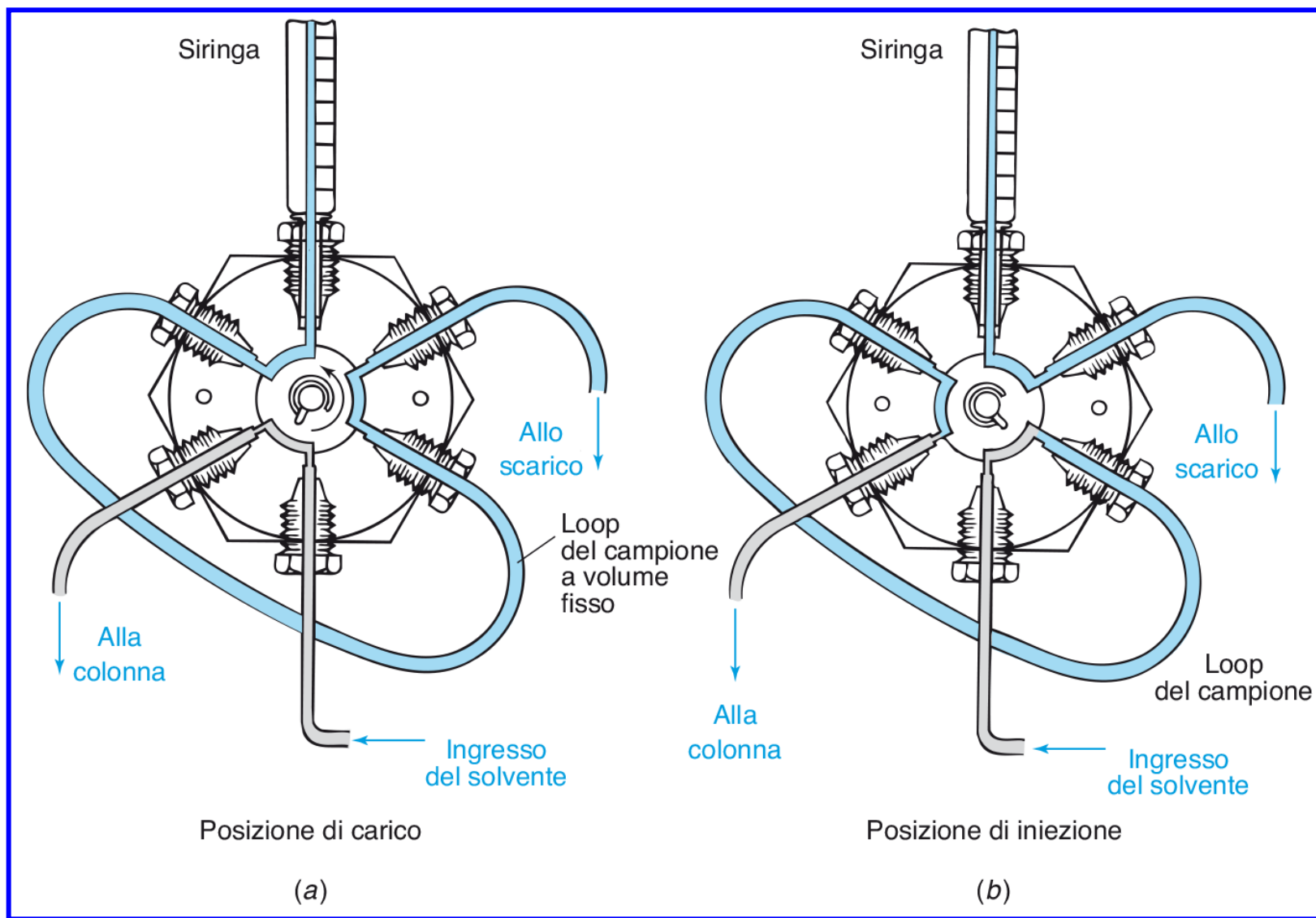
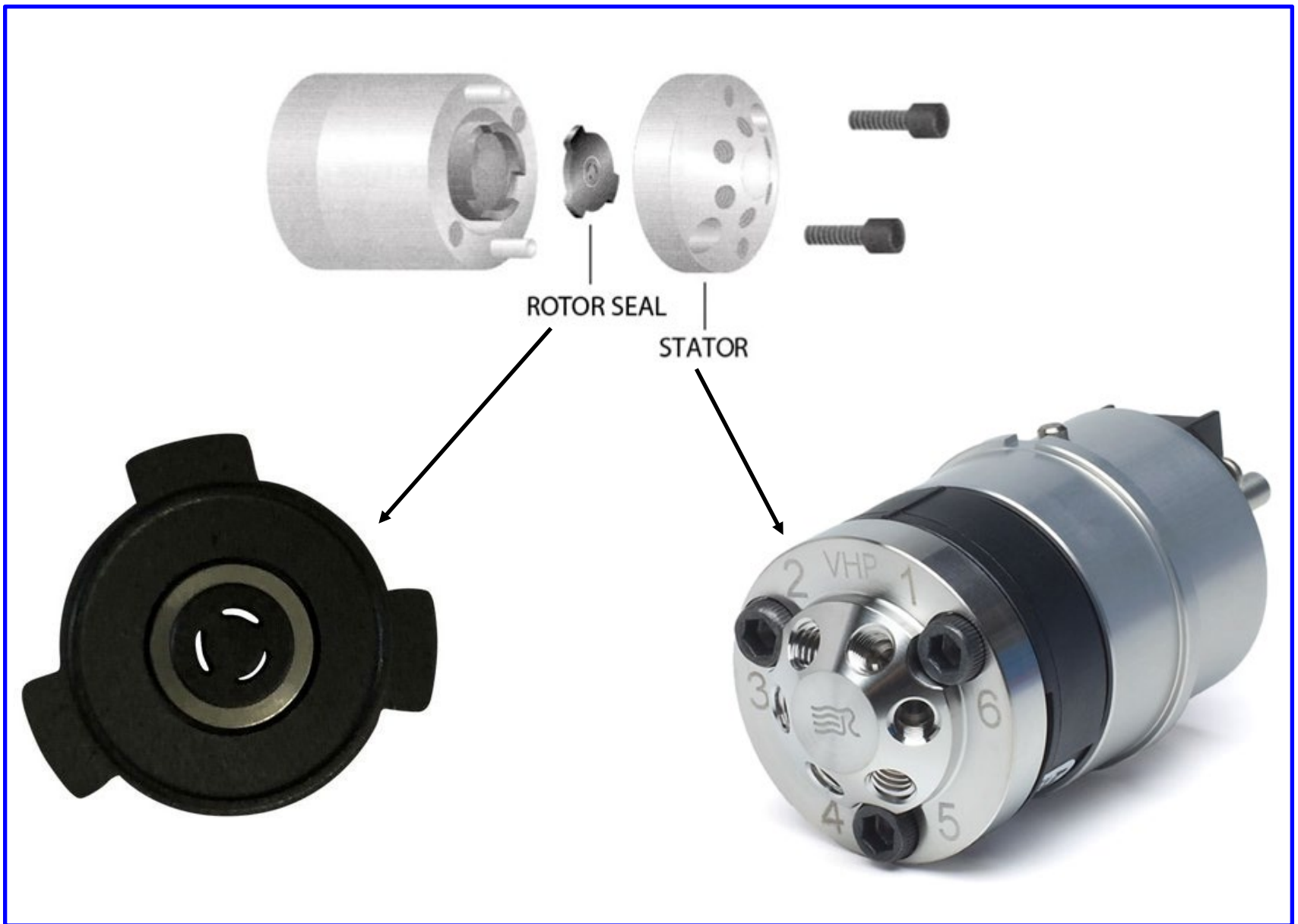


Immagine «esplosa» di una valvola di iniezione a sei vie



Rivelatori in HPLC

Vengono distinti in due categorie:

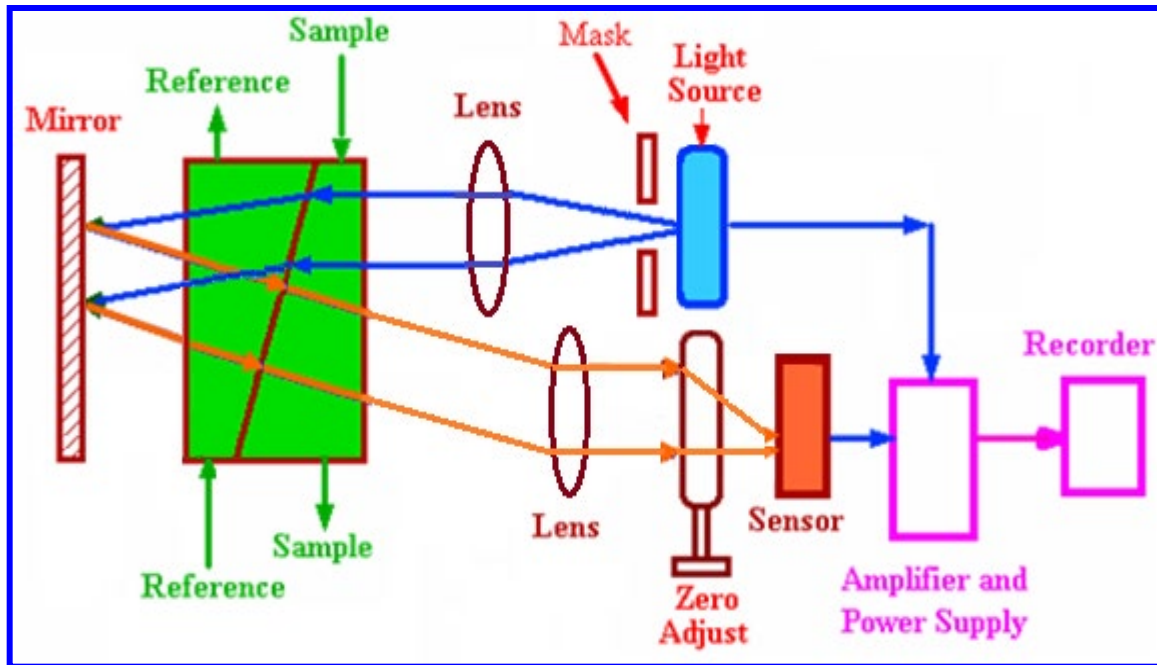
- ♣ Rivelatori di proprietà globali della fase mobile (indice di rifrazione, conducibilità elettrica, densità) → **bulk detectors**
- ♣ Rivelatori di **proprietà specifiche degli analiti** separati (assorbimento nella regione UV-visibile-IR, fluorescenza, elettroattività, ecc.)

Caratteristica fondamentale dei rivelatori HPLC

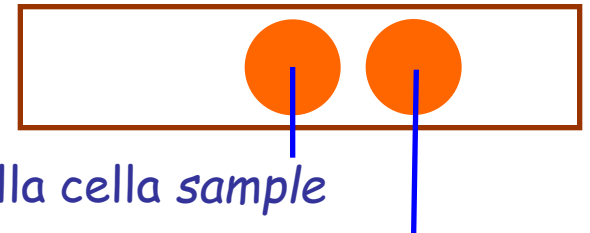
Il loro **volume interno dev'essere minimo** per evitare il ri-allargamento della banda caratteristica di un analita dopo l'uscita dalla colonna HPLC.

Tipicamente esso dev'essere **inferiore ad 1/10 del volume di fase mobile corrispondente ad un picco** (di solito 100 μL).

Rivelatori basati sull'indice di rifrazione



Principio di funzionamento: il passaggio di un analita nella cella "sample" genera una variazione di indice di rifrazione rispetto alla cella "reference" e quindi uno spostamento del punto in cui la radiazione emergente collide sul sensore:

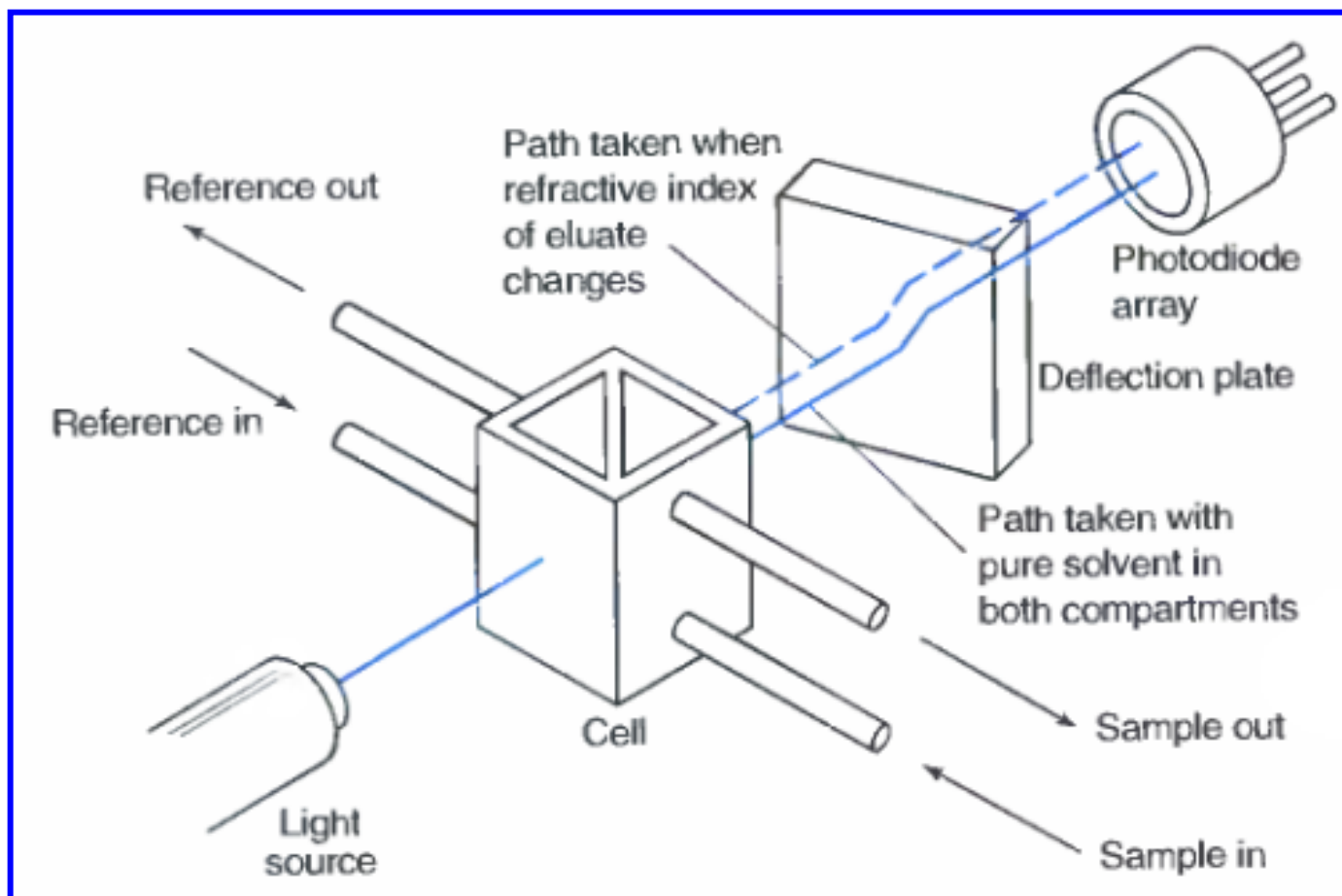


solo fase mobile nella cella *sample*

passaggio di un analita nella cella *sample*

Lo "**Zero Adjust**" è una lente che può spostarsi per consentire la rifocalizzazione nel punto centrale del sensore della radiazione rifratta in presenza di analita. Ad essa è collegato un pennino che descrive le variazioni di indice di rifrazione, tracciando, di fatto, il cromatogramma.

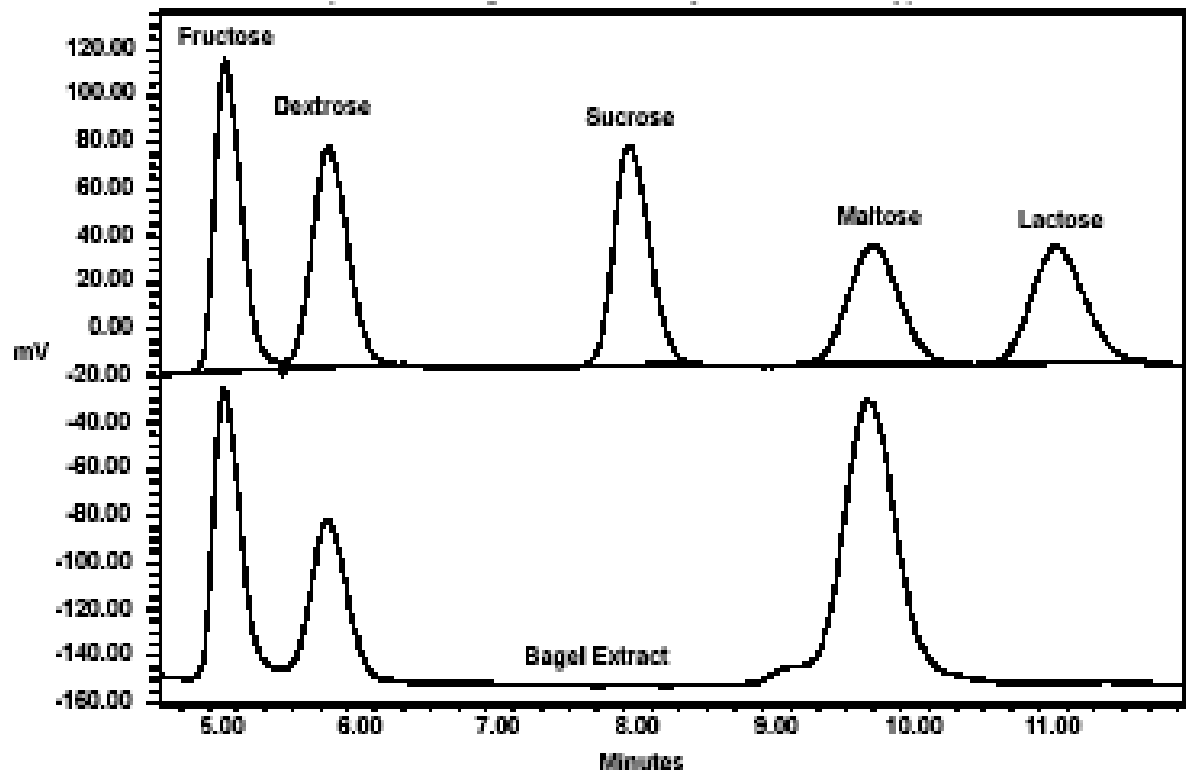
In una variante più moderna del rivelatore lo spostamento della radiazione dovuto alla rifrazione in presenza di analita viene percepito grazie ad una serie di fotodiodi:



Requisiti: la cella dev'essere rigorosamente termostata perché l'indice di rifrazione è sensibile alle **variazioni di temperatura**, inoltre **non si può variare la composizione della fase mobile** nel corso dell'eluizione.

Esempio di rivelazione basata sull'indice di rifrazione

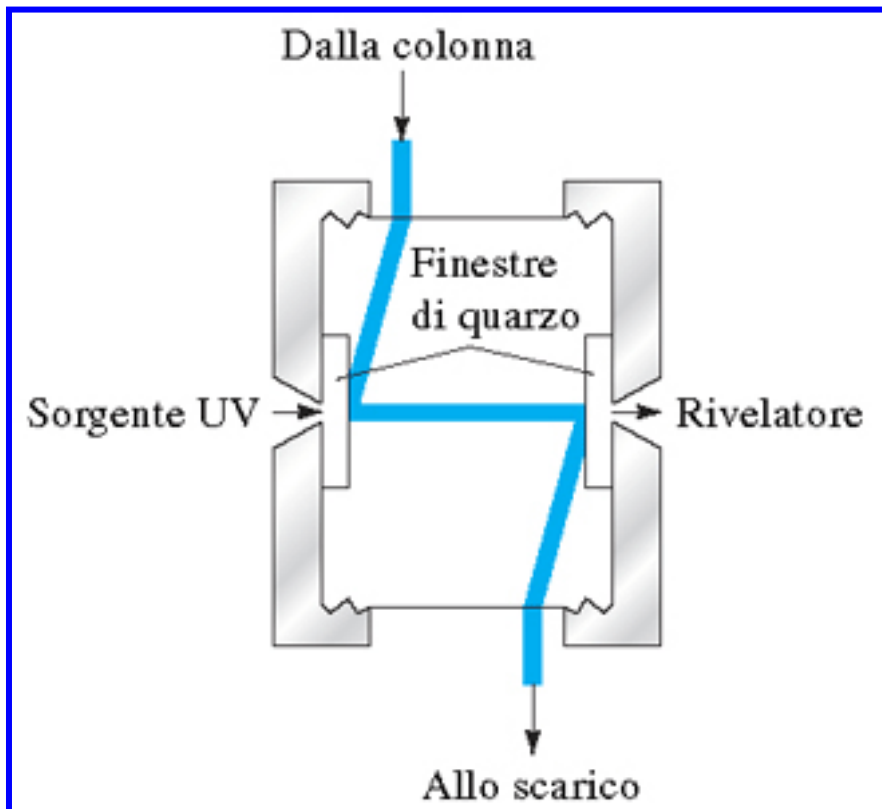
Separazione di carboidrati standard e di quelli presenti in un estratto di ciambella (bagel)



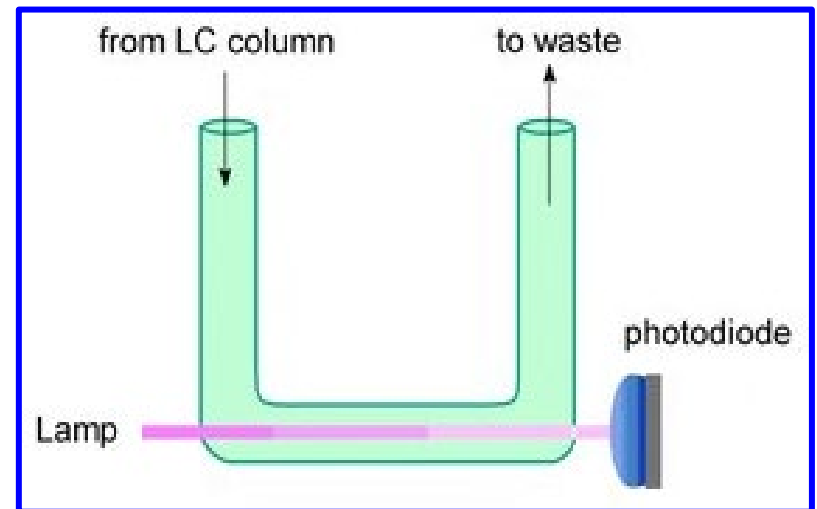
Rivelatori UV a lunghezza d'onda singola

Lunghezza d'onda fissa

La sorgente è una lampada a vapori di mercurio (emissione stabile e intensa a 254 nm) o un laser.



Cella con configurazione a Z



Cella con configurazione a U

Si fa in modo che la radiazione sia parallela alla direzione del flusso per minimizzare i problemi legati a variazioni dell'indice di rifrazione.

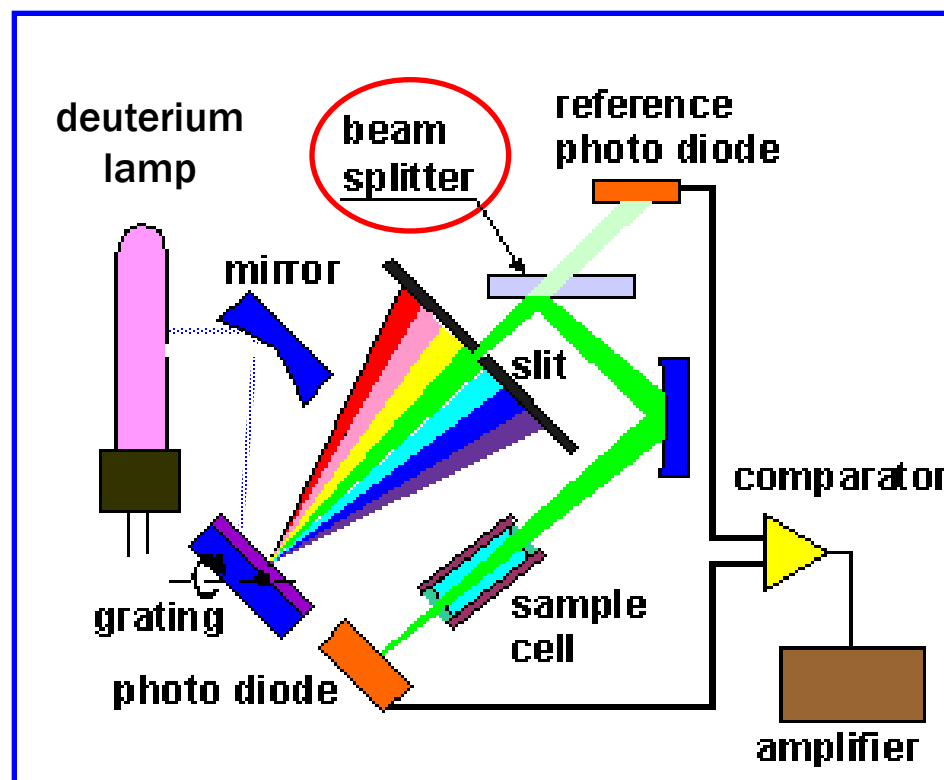
Lunghezza d'onda variabile

La sorgente è una lampada al deuterio, avente emissione continua, ed è accoppiata ad un monocromatore.

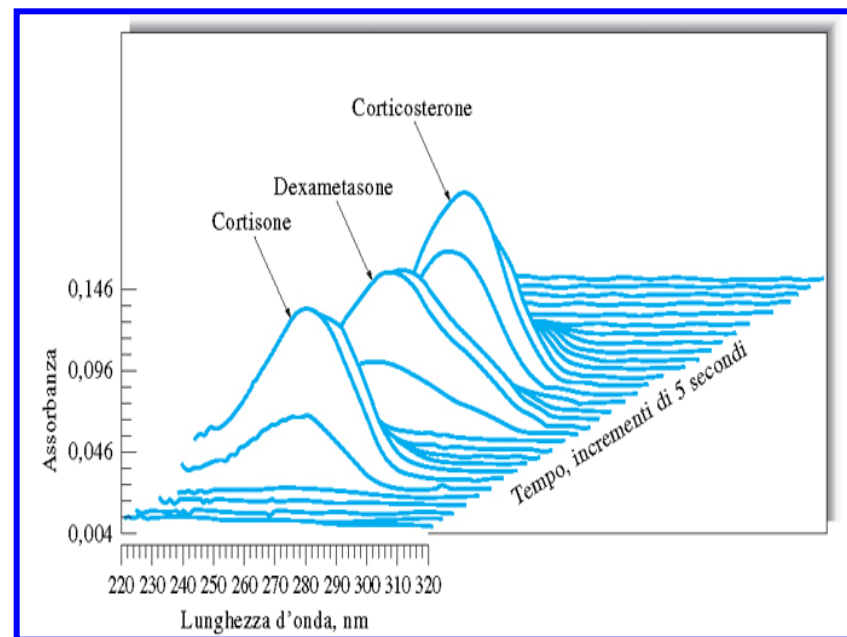
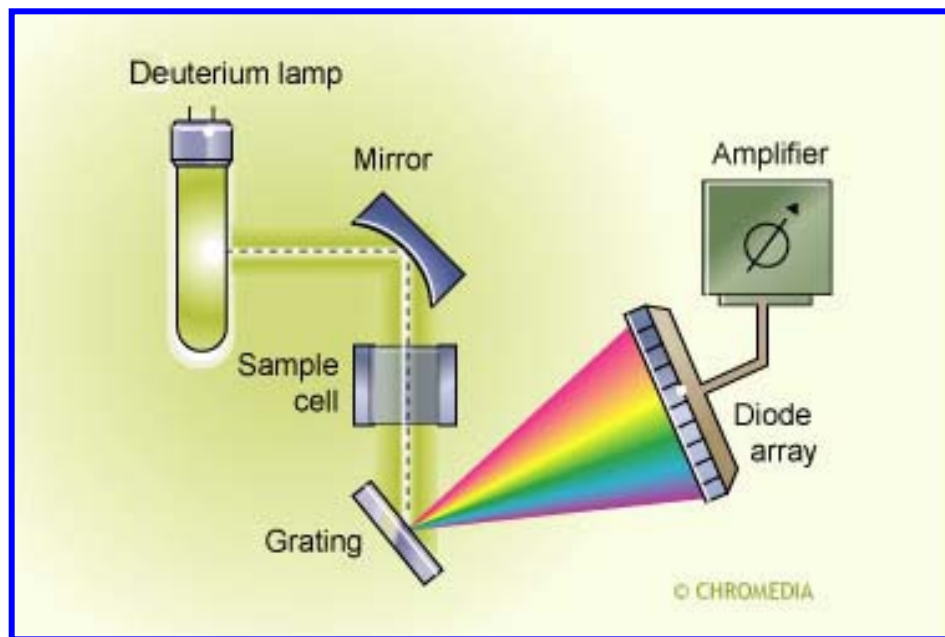
In questo caso è possibile scegliere una lunghezza d'onda ottimale per ciascun composto eluente, nell'intervallo 190-600 nm.

Il **beamsplitter** consente di sdoppiare la radiazione (selezionata con il reticolo), inviandone una parte ad un rivelatore di riferimento, che misura I_0 , l'altra alla cella in cui fluisce la fase mobile e poi ad un secondo rivelatore, che misura I .

Il comparatore confronta continuamente I_0 con I , fornendo l'assorbanza.



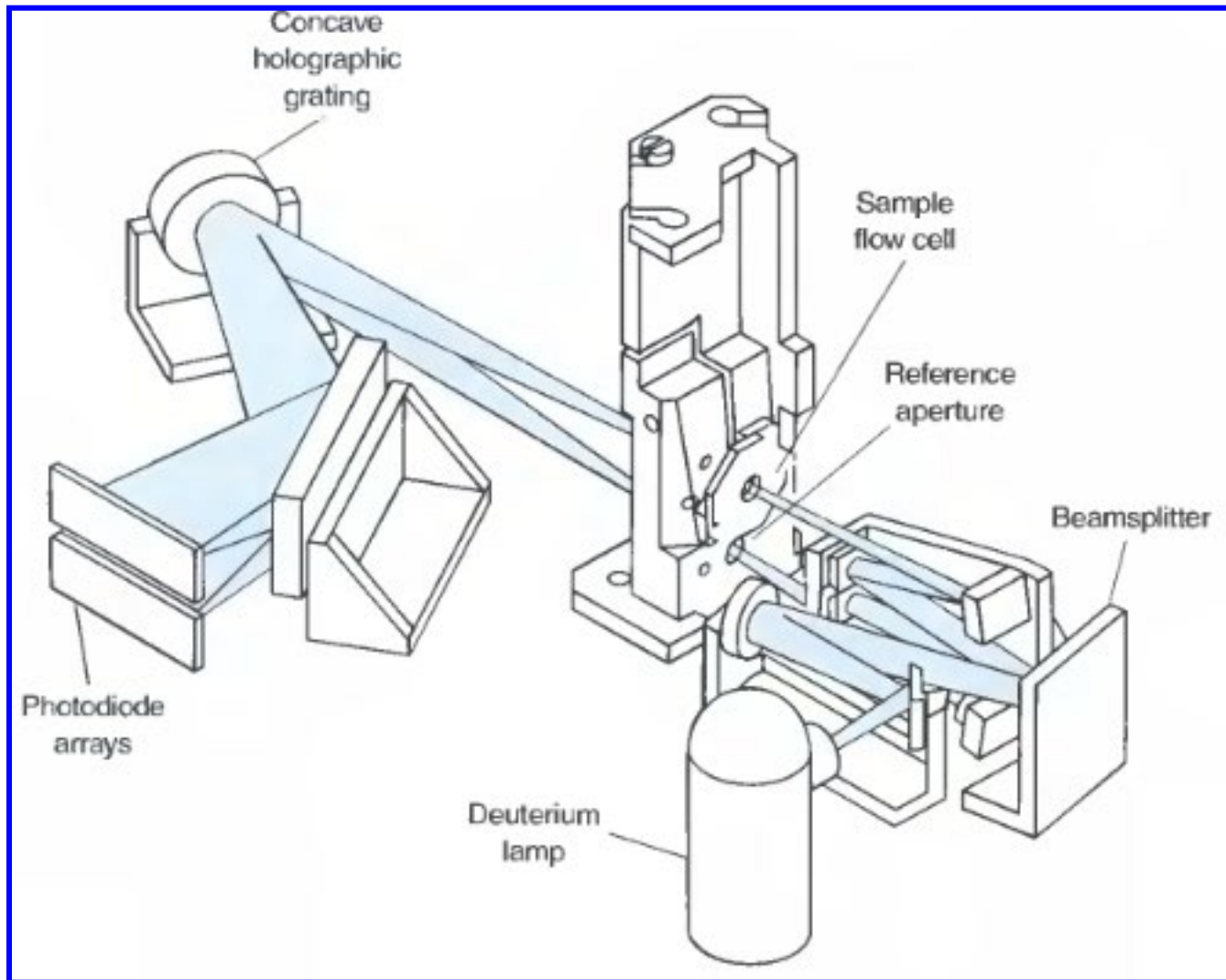
Rivelatori UV a serie di diodi (UV - DAD)



La presenza di un rivelatore a serie di diodi consente di registrare più volte un **intero spettro di assorbimento UV-visibile** durante l'eluizione di ciascun picco cromatografico.

Il confronto con spettri UV riportati in banche dati spettroscopiche può in alcuni casi consentire di identificare la specie eluente sotto il picco.

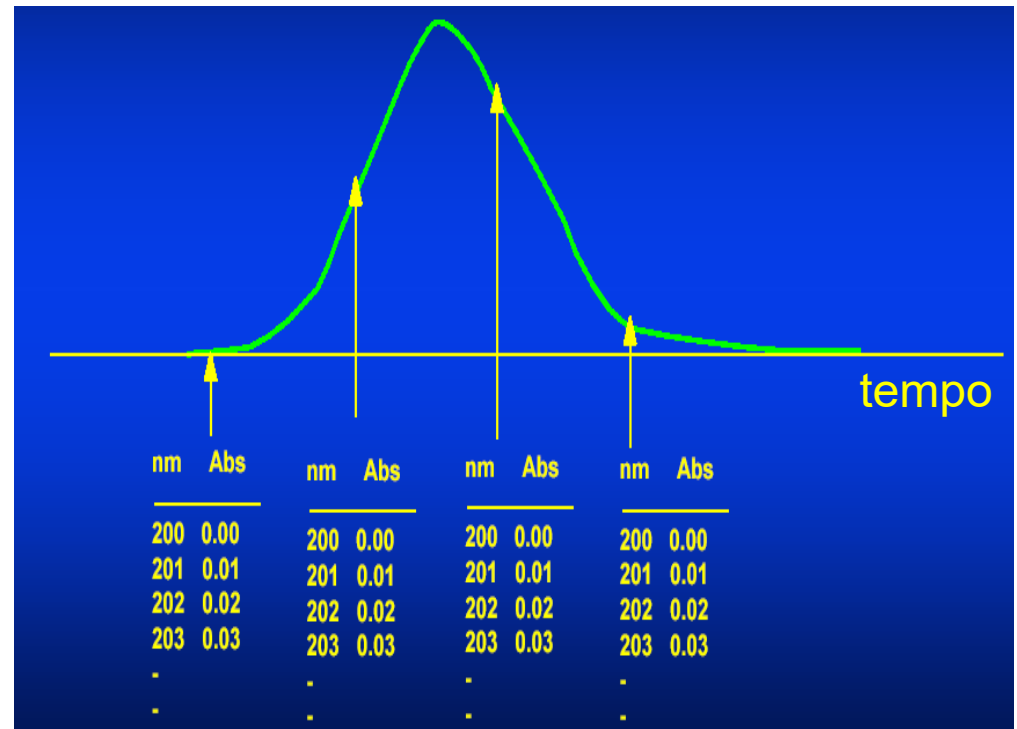
Esempio di **DAD** dotato di un **beamsplitter** e di due serie di **fotodiodi**, una destinata alla radiazione passante per la cella collegata alla colonna HPLC e l'altra alla radiazione di riferimento.



I dati ottenuti in questo caso sono di **natura tridimensionale** (tempo, lunghezza d'onda, assorbanza):

ad ogni punto di un picco del cromatogramma corrisponde uno spettro UV.

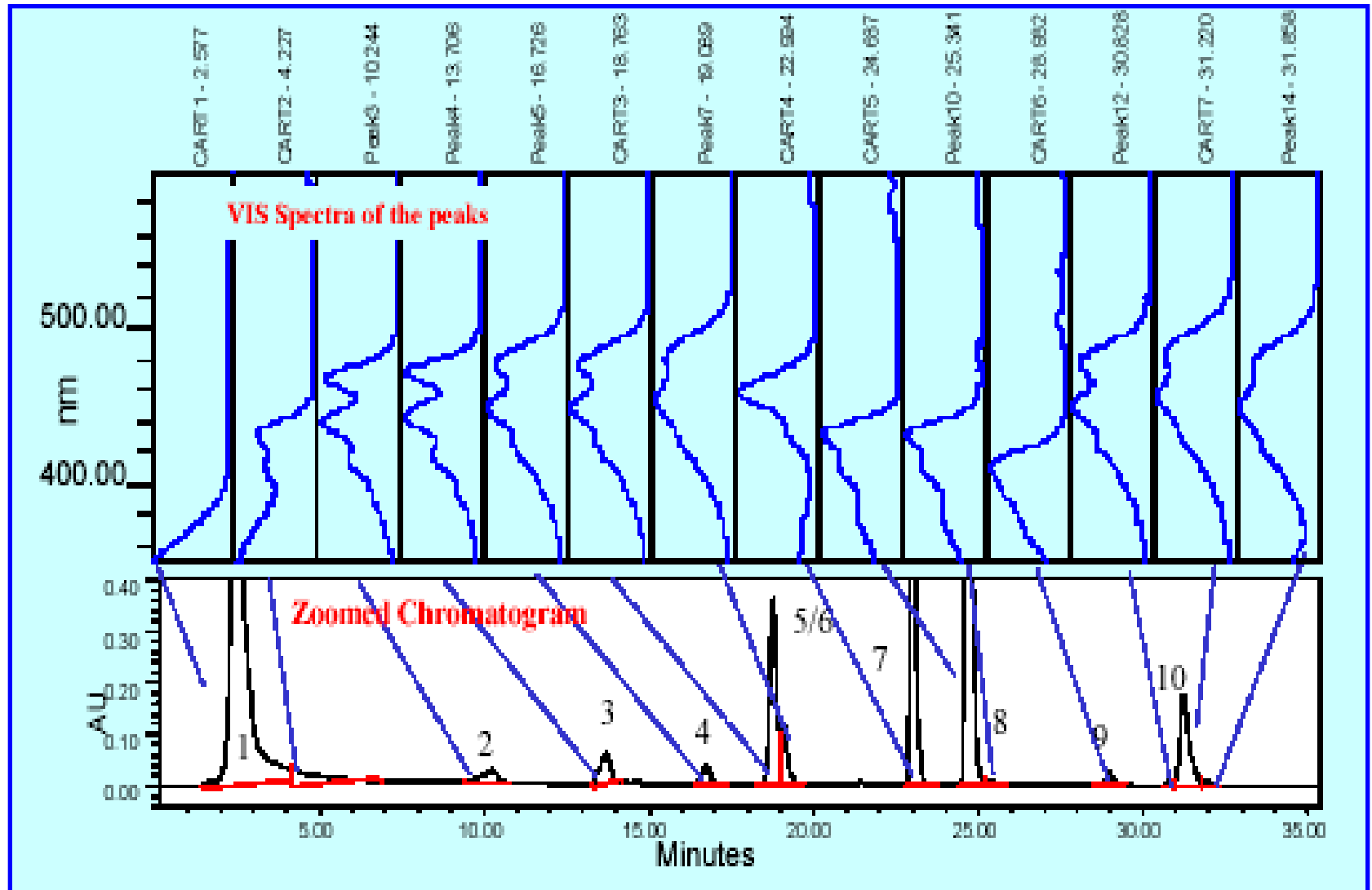
Il numero dei punti campionati sarà tanto maggiore quanto più veloce è l'acquisizione dello spettro.



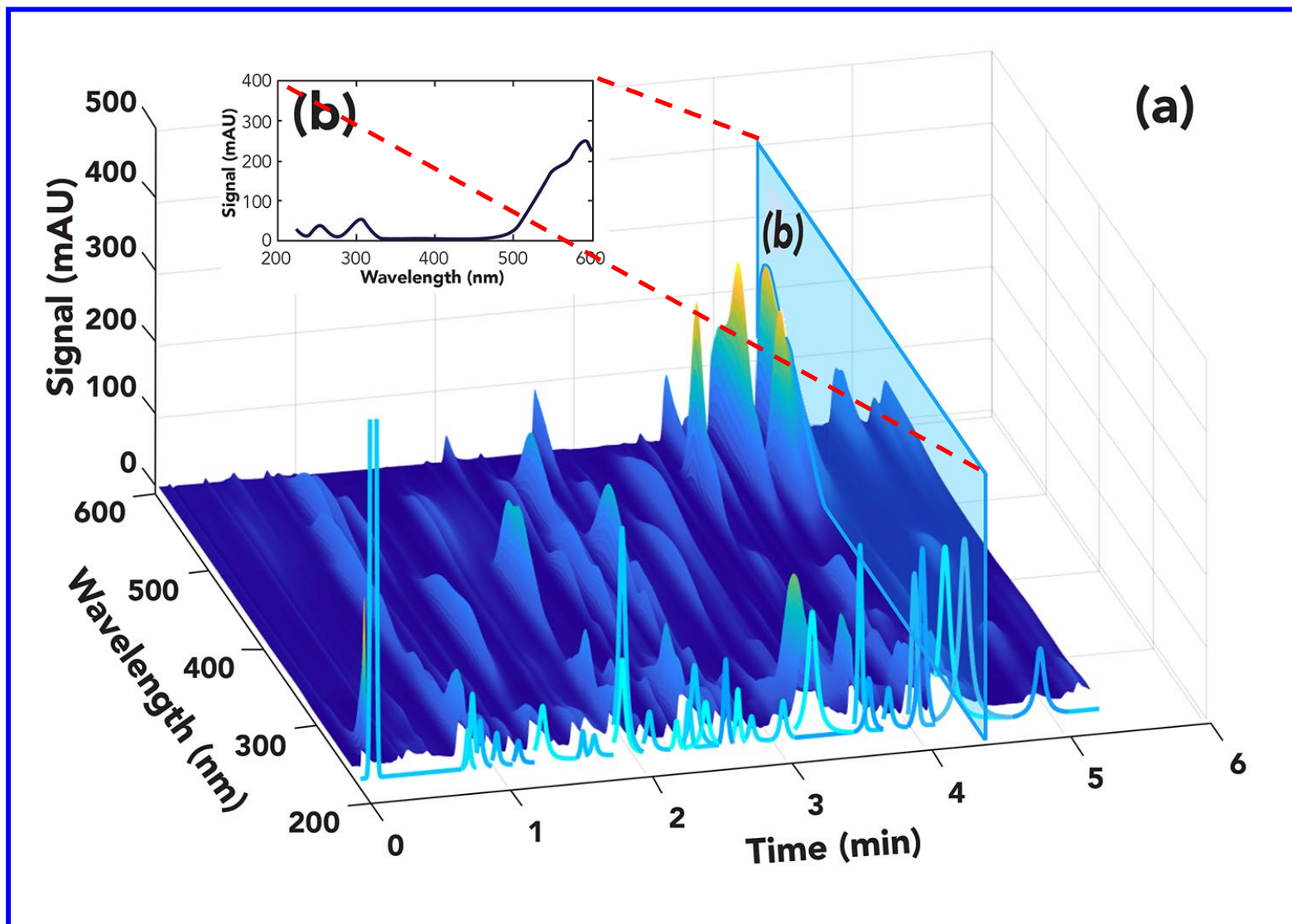
La ricostruzione del cromatogramma (ossia l'ottenimento dell'ordinata per ciascun punto) può essere effettuata con il computer in due modalità:

- ✓ **Assorbanza a λ selezionata:** si sceglie una lunghezza d'onda e si riporta la $A(\lambda)$ in funzione del tempo di ritenzione.
- ✓ **Assorbanza massima:** si riporta l'assorbanza massima registrata in ciascuno spettro di assorbimento registrato nel corso dell'eluizione.

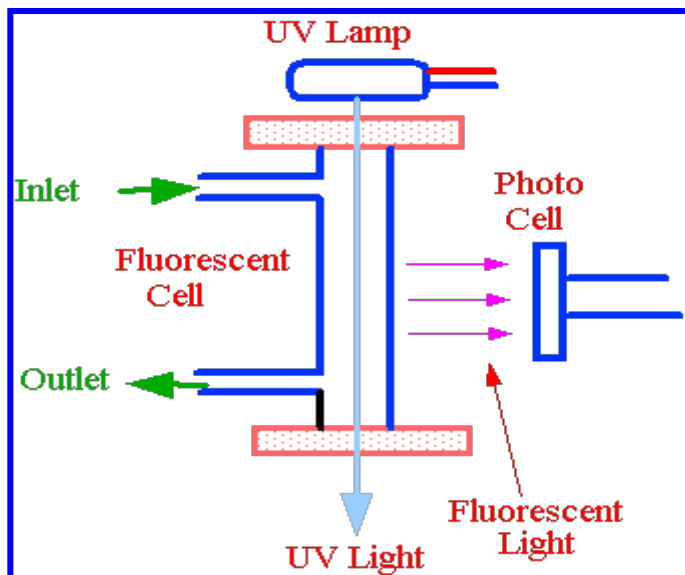
Un esempio: **separazione di una serie di pigmenti colorati (carotenoidi)** con rivelazione DAD nella regione del visibile:



Rappresentazione tridimensionale dei dati HPLC-DAD

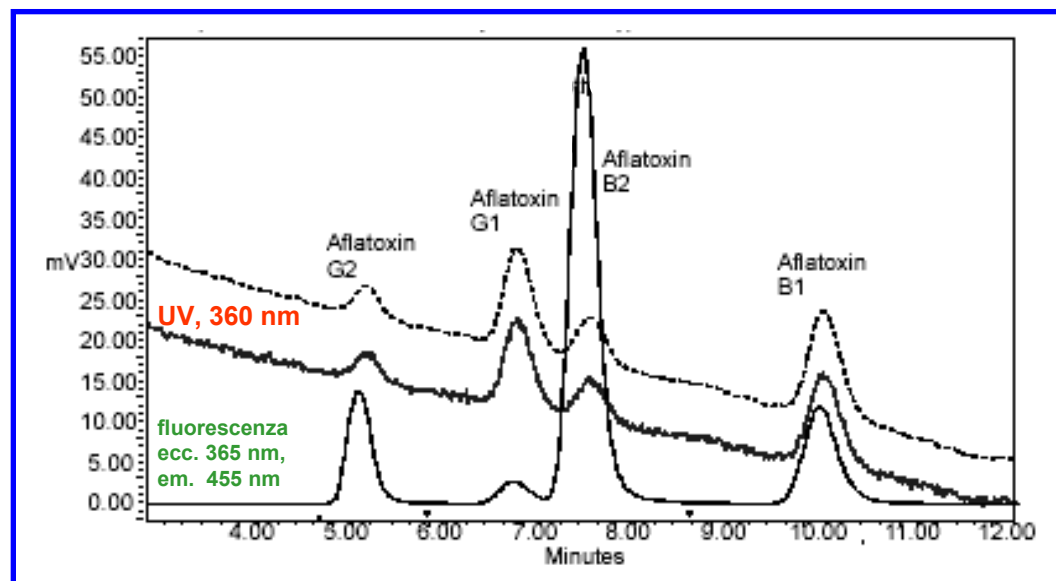


Rivelatori a fluorescenza



La misura viene effettuata in modo analogo a quanto accade in uno spettrofluorimetro, tuttavia al posto della cuvetta è posta una cella attraversata dalla fase mobile.

La radiazione di fluorescenza viene campionata perpendicolarmente alla direzione delle radiazione incidente, passando attraverso una parete trasparente.



I rivelatori a fluorescenza presentano la sensibilità più alta fra i rivelatori HPLC.

Confronto fra rivelatori HPLC

Rivelatori	LOD, g/mL	Minima quantità rivelabile
Indice di rifrazione	10^{-8}	100 ng-1 μ g
Assorbimento UV	10^{-11}	100 pg - 1 ng
Fluorescenza	10^{-13}	1-10 pg

Spettr. di massa	10^{-11}	100 pg - 1 ng
Conducibilità elettr.	10^{-10}	500 pg - 1 ng
Elettrochimici	10^{-12} - 10^{-10}	10 pg - 1 ng
Assorbimento IR	10^{-7}	1 μ g

Colonne e particelle di impaccamento per HPLC

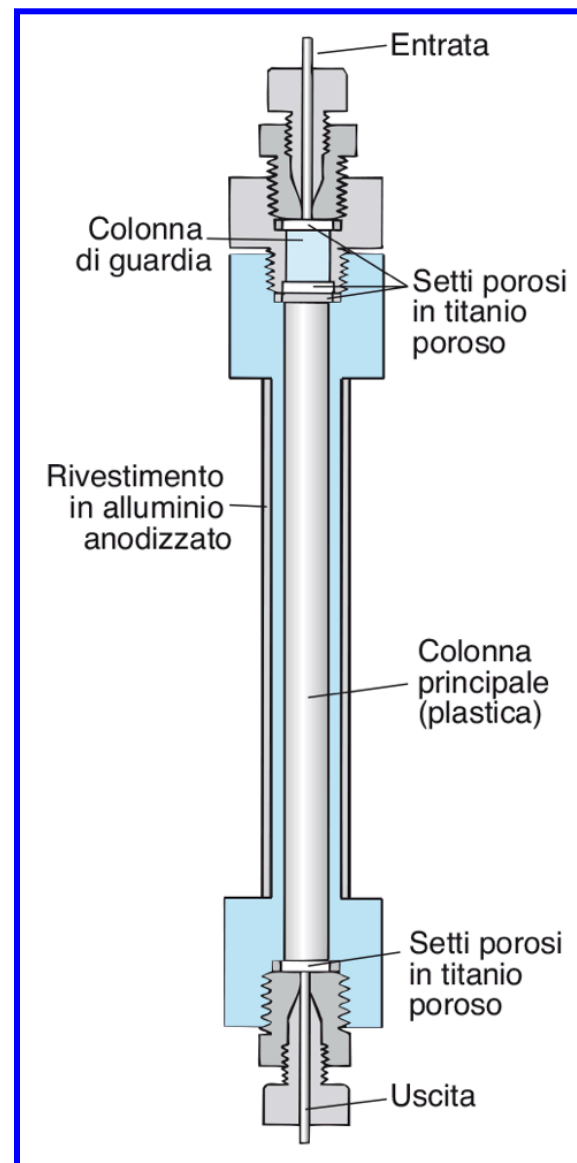
Colonne

Sono tipicamente cilindri cavi in acciaio, alluminio o plastica (eventualmente circondati da una camicia in alluminio) di **lunghezza da 5 a 30 cm** e diametro interno da **2 a 10 mm**, riempiti con particelle di materiale di supporto di diametro **1-10 μm** (a cui corrisponde un numero di piatti teorici da 40000 a 60000 per metro).



I **setti porosi in titanio** distribuiscono uniformemente nella colonna la fase mobile entrante attraverso un sottile tubicino.

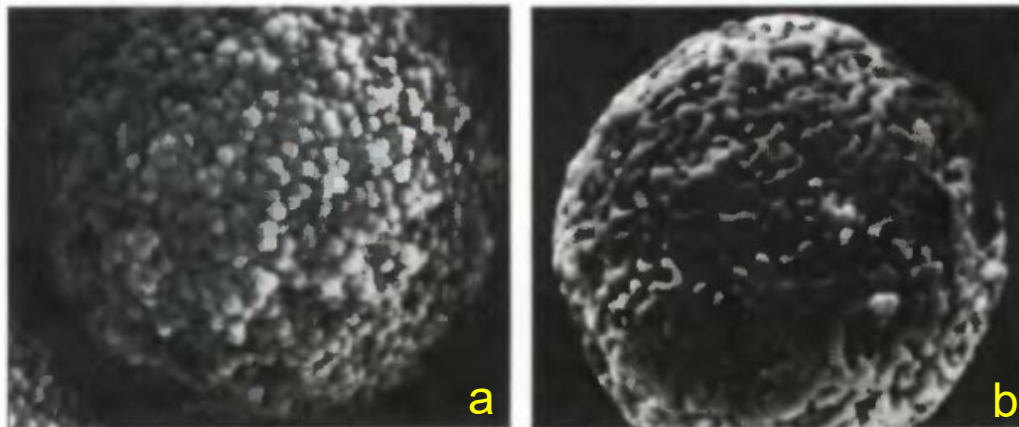
La **colonna di guardia** (che può essere anche esterna) funge da colonna "sacrificale", catturando particelle di grandi dimensioni, sfuggite alla filtrazione dei solventi, che potrebbero otturare la colonna analitica.



Particelle di impaccamento

Sono tipicamente realizzate in materiale siliceo (come in GC) e si distinguono in due principali categorie.

- ♦ **Particelle pellicolari** - hanno diametro variabile da 30 a 40 μm , ricoperte in superficie da un sottile strato (1-2 μm) di fase stazionaria. Si usano ormai soprattutto per le colonne di guardia (precolonne).
- ♦ **Particelle porose** - hanno diametro variabile tra 1 e 10 μm e sono dotate di canalicoli interni il cui foro di accesso ha un diametro di 100-500 Å. Sono costituite o da aggregati di particelle silicee porose di piccole dimensioni (a) o da strutture a spugna (b), caratterizzate da canalicoli.



Confronto fra le caratteristiche delle particelle pellicolari e porose

Proprietà	Particelle pellicolari	Particelle porose
Altezza di piatto teorico (mm)	0.2-0.4	0.01-0.03
Lunghezza di colonna (cm)	50-100	10-30
Diametro di colonna (mm)	2	3-5
Caduta di pressione (psi/cm)	0.5	5
Area superficiale (m ² /g)	10-15	400-600
Impaccamento	Semplice, a secco	Complesso e costoso

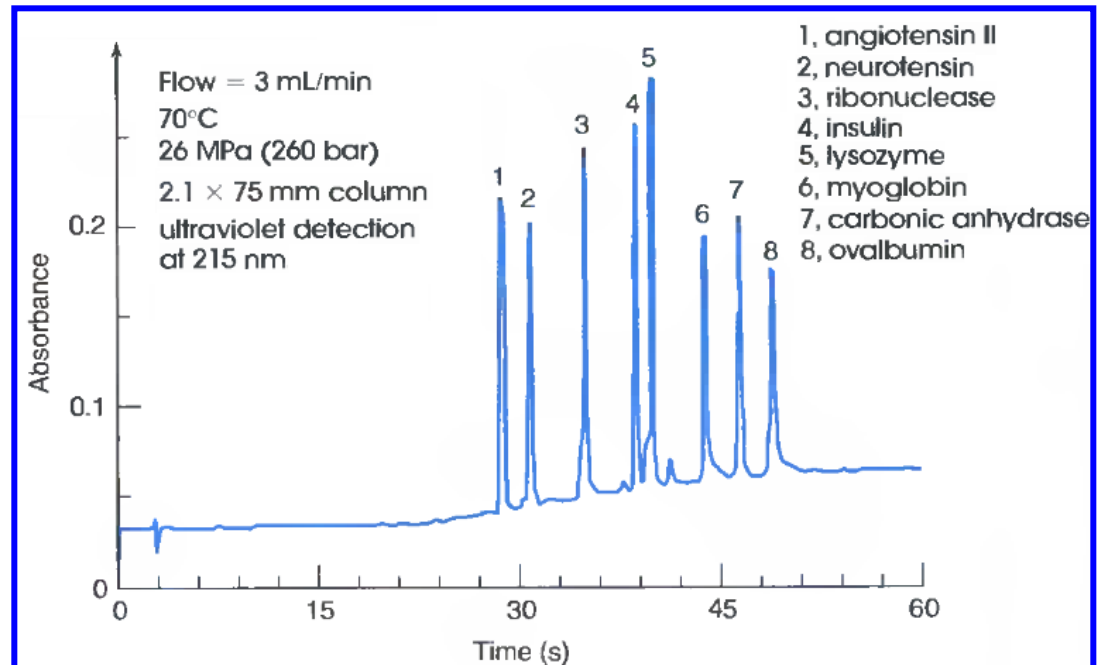
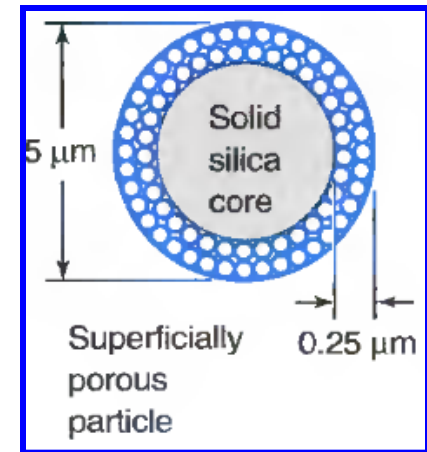
Tipologie di colonne HPLC di sviluppo più recente

Colonne impaccate con particelle *core-shell*

Le particelle *core-shell* hanno un nucleo di silice non porosa circondato da un sottile strato di silice porosa.

La diminuzione della superficie interfacciale fra fase stazionaria e mobile, rispetto alle

particelle porose, è compensata dalla **diminuzione del contributo del termine C_M nell'equazione di Van Deemter, con conseguente incremento dell'efficienza.**

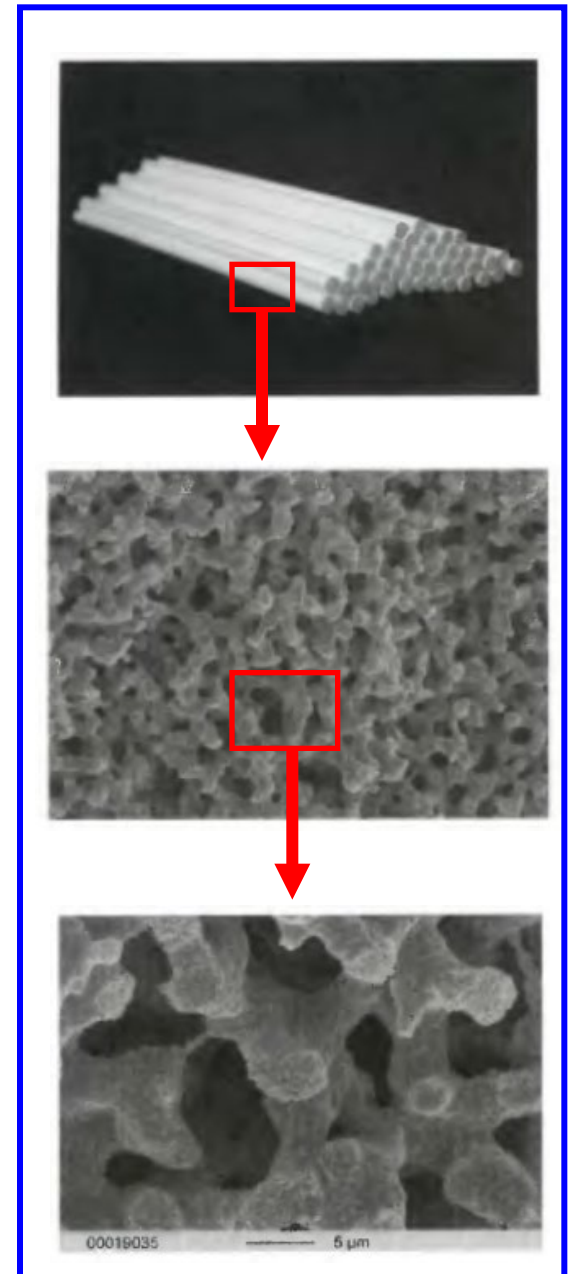


Colonne monolitiche

Le colonne monolitiche sono realizzate incastonando in un cilindro in materiale plastico una barra cilindrica di silice ottenuta per polimerizzazione di precursori in soluzione.

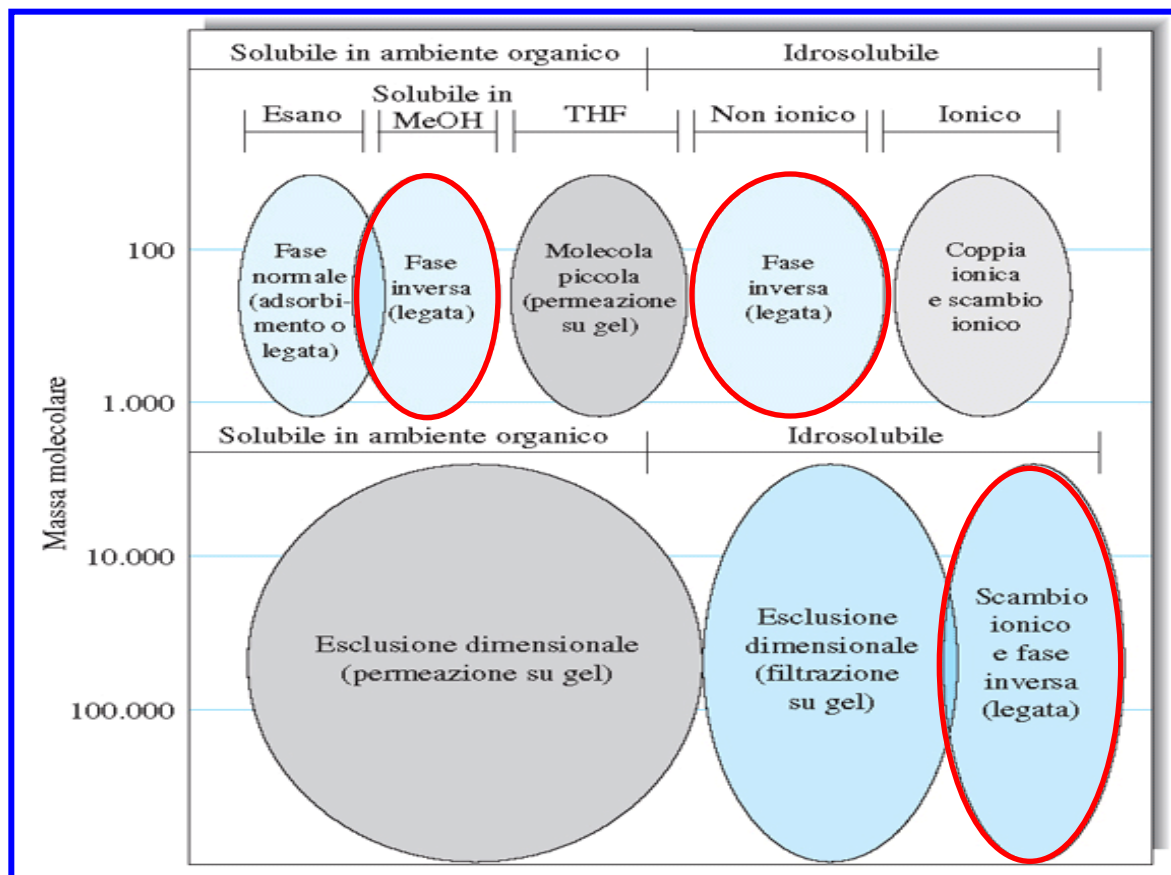
La silice così ottenuta è estremamente porosa (l'80% del volume di una barra è vuoto) e caratterizzata da pori principali di diametro circa $2\text{ }\mu\text{m}$ e pori molto più piccoli (13 nm) posizionati sullo scheletro di silice.

La struttura aperta e rigida della silice monolitica abbatte la contropressione incontrata dalla fase mobile, consentendo di lavorare a flussi molto elevati (anche 10 mL/min).



Fasi stazionarie per HPLC

La natura chimica della fase stazionaria in HPLC è molto variabile e determina il tipo di tecnica:

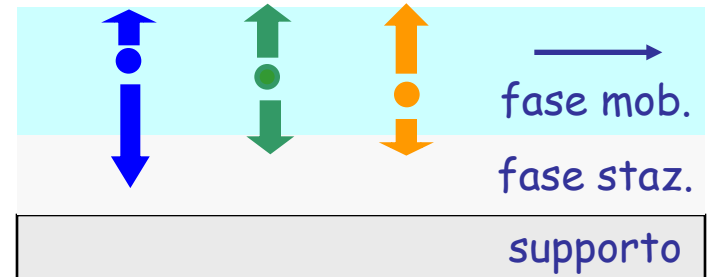


La cromatografia di ripartizione, soprattutto nella variante in fase inversa, è in assoluto la tecnica HPLC più utilizzata.

Cromatografia di ripartizione

In questo caso ciascun analita si ripartisce fra la fase mobile e la fase stazionaria.

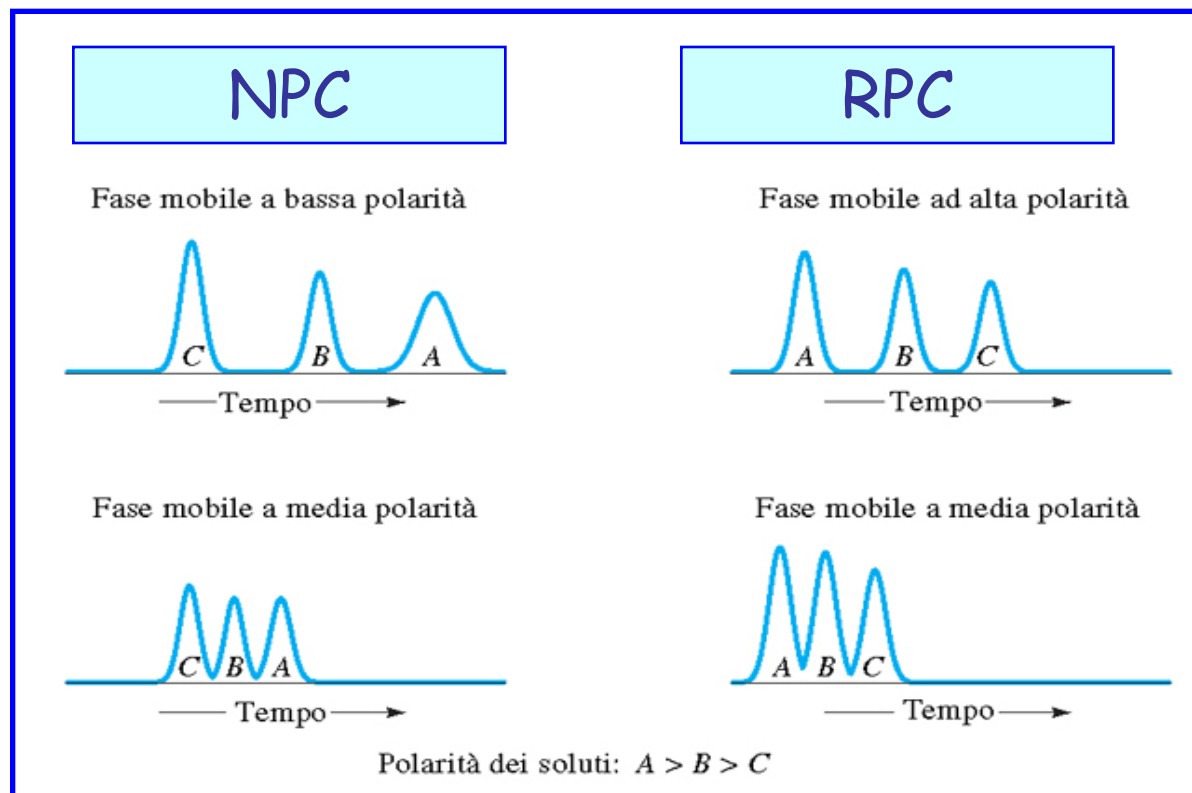
Il tempo di ritenzione sarà determinato dalla competizione fra le affinità di ciascun analita per la fase mobile e per la fase stazionaria



Storicamente è stata suddivisa in due tecniche:

- ★ Cromatografia di ripartizione in **fase diretta (NPC)** - la fase stazionaria è polare mentre quella mobile è apolare.
- ★ Cromatografia di ripartizione in **fase inversa (RPC)** - la fase stazionaria è apolare mentre quella mobile è polare (di solito acqua modificata con un solvente come metanolo o acetonitrile).

Si possono fare delle **previsioni sui tempi di ritenzione** in base alla polarità degli analiti da separare:



- in **NPC** eluiscono più tardi i composti più polari e i loro tempi di ritenzione possono essere diminuiti aumentando la polarità della fase mobile
- in **RPC** eluiscono più tardi i composti meno polari e i loro tempi di ritenzione possono essere diminuiti riducendo la polarità della fase mobile

Caratteristiche di solventi usati in HPLC

NPC

polarità

RPC

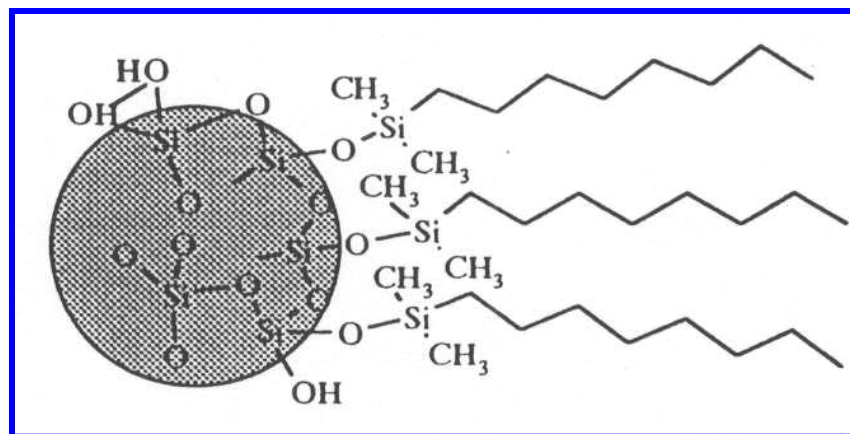
Solvente	Indice di rifrazione ^a	Viscosità, cP ^b	Punto di ebollizione, °C	Indice di polarità, P' ⁱ	Forza dell'eluente, ^c ϵ^0
Fluoroalcani ^d	1,27-1,29	0,4-2,6	50-174	<-2	-0,25
Cicloesano	1,423	0,90	81	0,04	-0,2
<i>n</i> -Esano	1,372	0,30	69	0,1	0,01
1-Clorobutano	1,400	0,42	78	1,0	0,26
Tetracloruro di carbonio	1,457	0,90	77	1,6	0,18
Etere <i>i</i> -propilico	1,365	0,38	68	2,4	0,28
Toluene	1,494	0,55	110	2,4	0,29
Etere dietilico	1,350	0,24	35	2,8	0,38
Tetraidrofurano	1,405	0,46	66	4,0	0,57
Cloroformio	1,443	0,53	61	4,1	0,40
Etanolo	1,359	1,08	78	4,3	0,88
Acetato di etile	1,370	0,43	77	4,4	0,58
Diossano	1,420	1,2	101	4,8	0,56
Metanolo	1,326	0,54	65	5,1	0,95
Acetonitrile	1,341	0,34	82	5,8	0,65
Nitrometano	1,380	0,61	101	6,0	0,64
Glicole etilenico	1,431	16,5	182	6,9	1,11
Acqua	1,333	0,89	100	10,2	Grande

La forza eluente in questo caso si riferisce al processo di adsorbimento su silice.

Fasi stazionarie per HPLC di ripartizione

Le fasi stazionarie più usate per HPLC di ripartizione sono **fasi legate**.

La natura dei gruppi legati determina il tipo di tecnica:



NPC

- $\text{C}_2\text{H}_4\text{CN}$, ciano
- $\text{C}_3\text{H}_6\text{N}(\text{CH}_3)_2$, dimetilammino
- $\text{C}_3\text{H}_6\text{NH}_2$, ammino
- $\text{C}_3\text{H}_6\text{OCH}_2\text{CHOHCH}_2\text{OH}$, diolo

polarità

RPC

- CH_3 , metile (C1)
- C_8H_{17} , ottile (C8)
- $\text{C}_{12}\text{H}_{25}$, dodecile (C12)
- $\text{C}_{18}\text{H}_{37}$, ottadecile (C18)

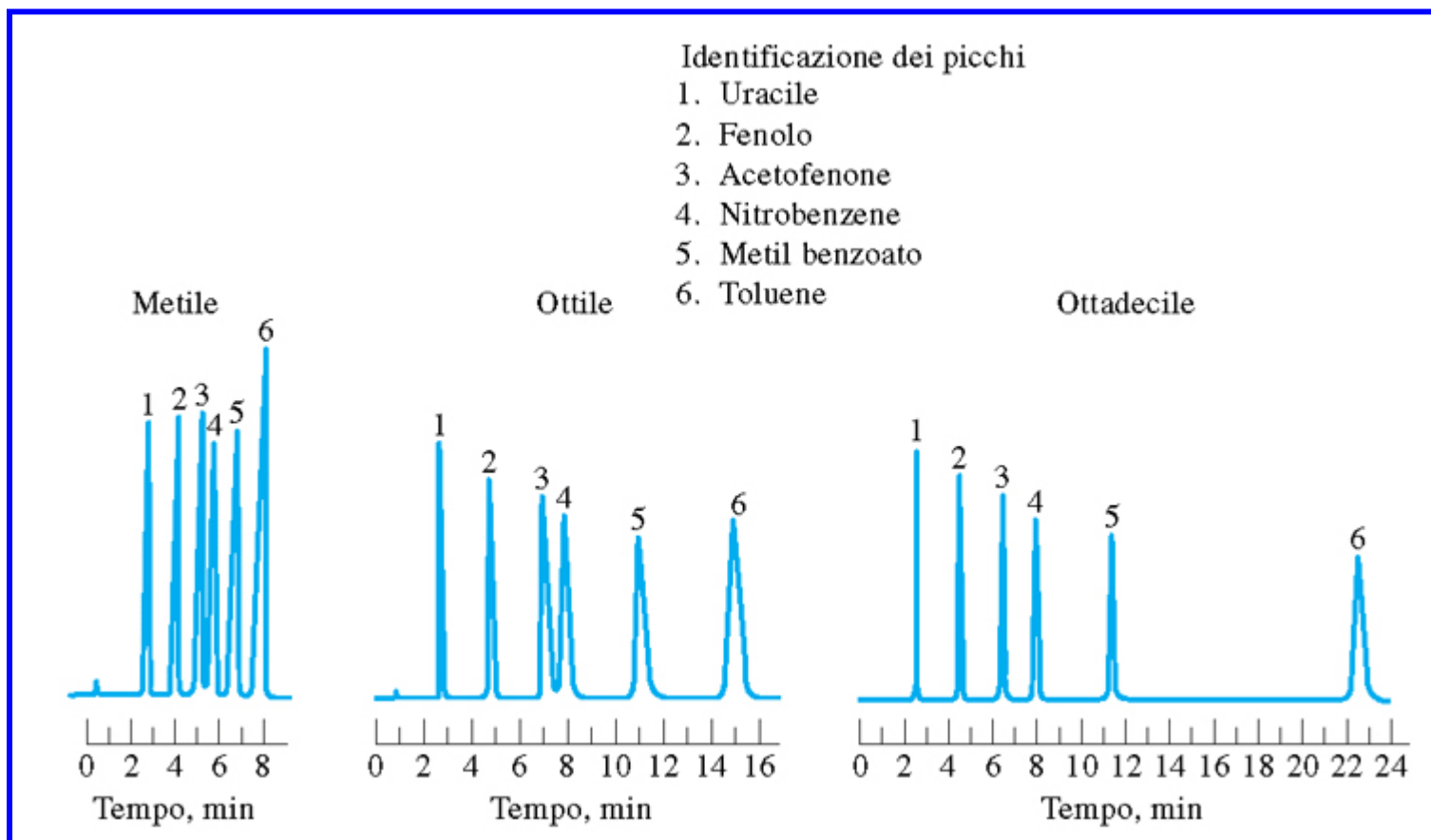
polarità

Vantaggi della tecnica RPC

La tecnica RPC a fase legata e' attualmente di gran lunga quella piu' utilizzata in HPLC di ripartizione, per una serie di vantaggi rispetto alla NPC:

- 👍 l'acqua, la fase mobile predominante, è poco costosa e facilmente disponibile e i campioni acquosi possono essere direttamente iniettati nelle fasi mobili;
- 👍 i solventi non acquosi utilizzati per la fase mobile (metanolo, acetonitrile) sono facilmente disponibili e ad elevato grado di purezza;
- 👍 usando opportuni additivi (tamponi, reagenti che formano coppie ioniche) e' possibile analizzare in RPC sia analiti non ionici che analiti ionici o ionizzabili (cromatografia di ripartizione a soppressione ionica).

Effetto della variazione di fase stazionaria in RPC: un esempio



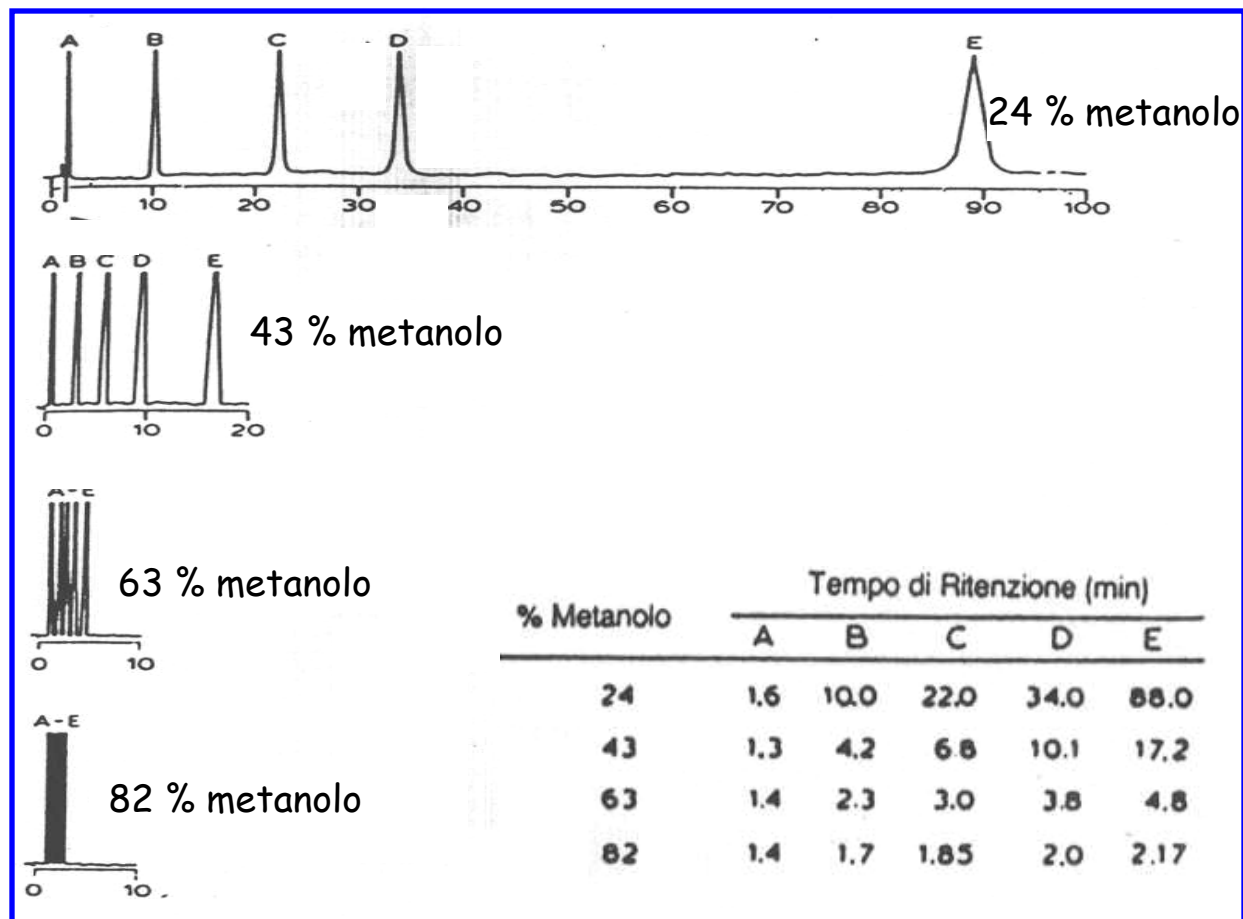
La diminuzione della polarità della fase stazionaria ($C1 \rightarrow C8 \rightarrow C18$) aumenta il tempo di ritenzione dei composti meno polari, migliorando la separazione, anche se a scapito del tempo totale di analisi.

Effetto della variazione di fase mobile in RPC: un esempio

Separazione su
colonna C18 di:

A uracile
B fenolo
C benzaldeide
D nitrobenzene
E metil-benzoato

Fase mobile:
acqua-metanolo



L'aumento della percentuale di metanolo abbassa la polarità complessiva della fase mobile, avvicinando gli analiti meno polari (C, D, E) a quelli più polari. La condizione ideale corrisponde al 43 % di metanolo.

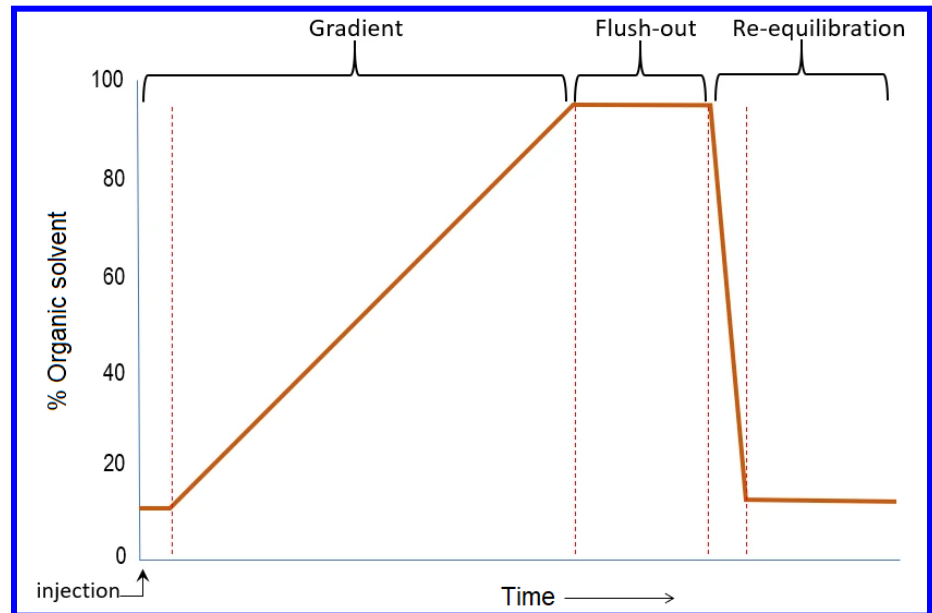
RPC con eluizione a gradiente

Non sempre è possibile separare tutti gli analiti in miscele complesse adoperando una fase mobile a composizione costante, ossia in **modalità isocratica**.

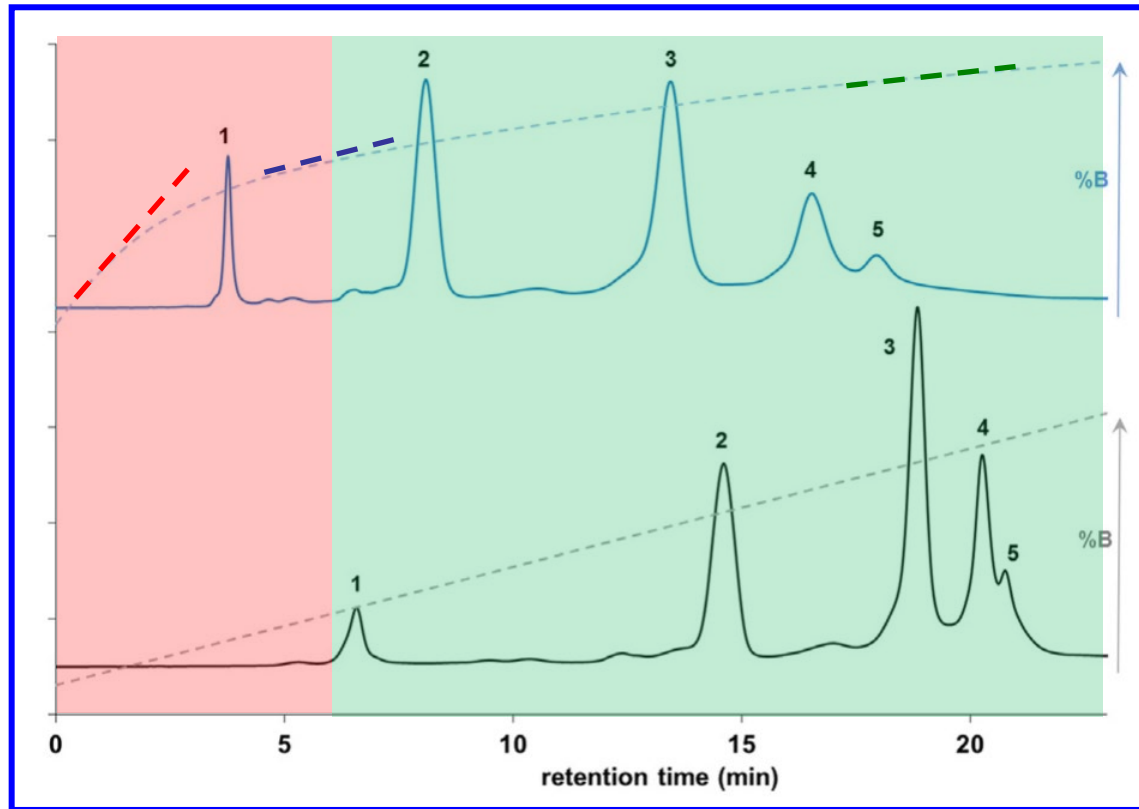
L'alternativa consiste nell'**eluizione a gradiente**, ossia la variazione progressiva della composizione della fase mobile durante la separazione.

Nel caso di una separazione RPC si **aumenta progressivamente la percentuale del/dei solventi organici (meno polari) mescolati all'acqua nella fase mobile**.

Si possono creare gradienti di eluizione anche con quattro diversi solventi, inoltre il gradiente può essere non lineare.



L'incremento non lineare del solvente organico (B) può consentire di separare meglio picchi non ben separati con un gradiente lineare:

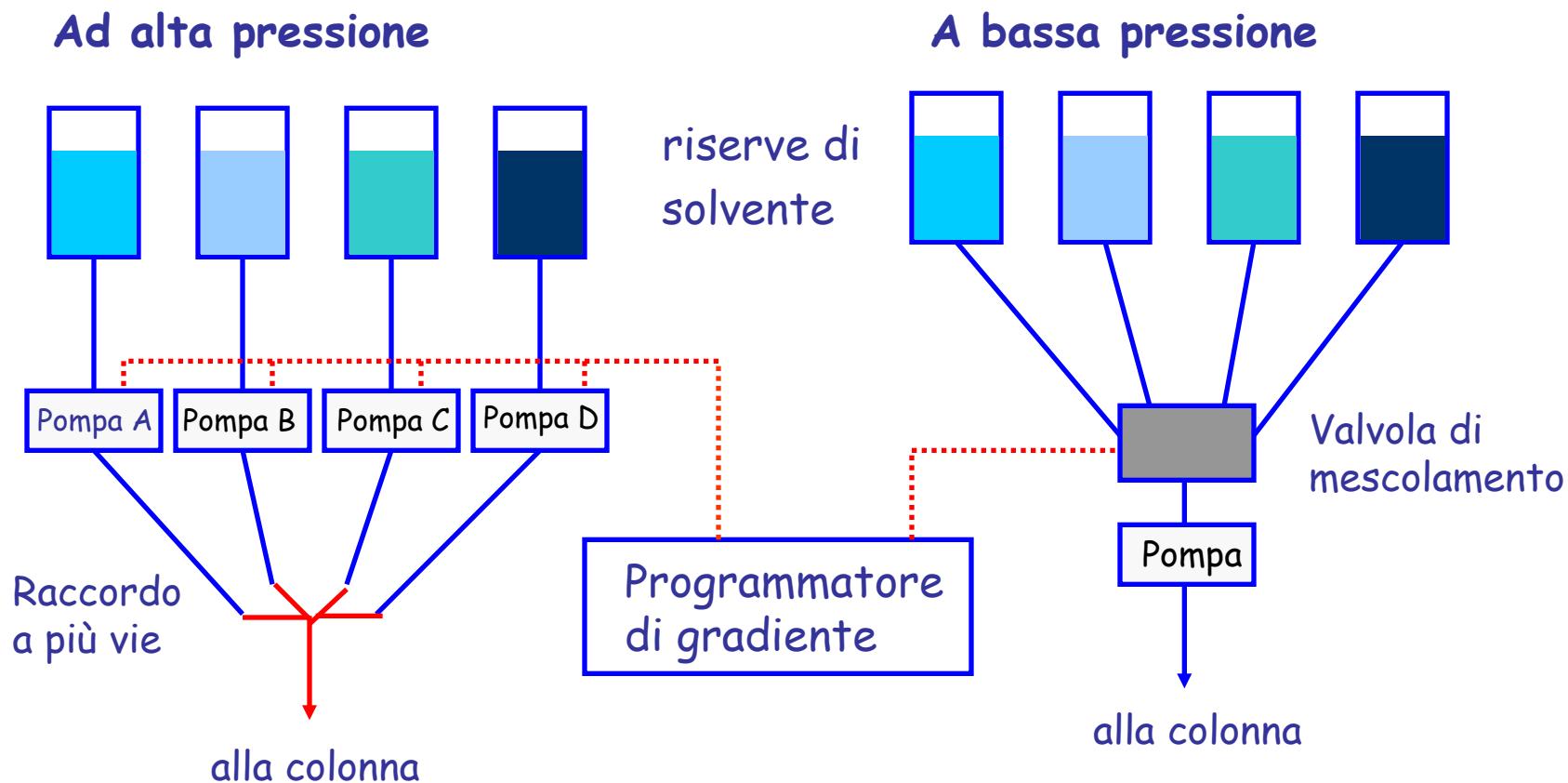


Nella zona rossa la pendenza del gradiente curvo è superiore a quella del gradiente lineare e questo fa arretrare i picchi, in particolare il picco 1.

Via via la pendenza diminuisce e, al confine fra zona rossa e zona verde diventa uguale a quella del gradiente lineare.

Nella zona verde la pendenza del gradiente curvo diventa inferiore a quella del gradiente lineare e questo facilita la separazione fra i picchi 3, 4 e 5.

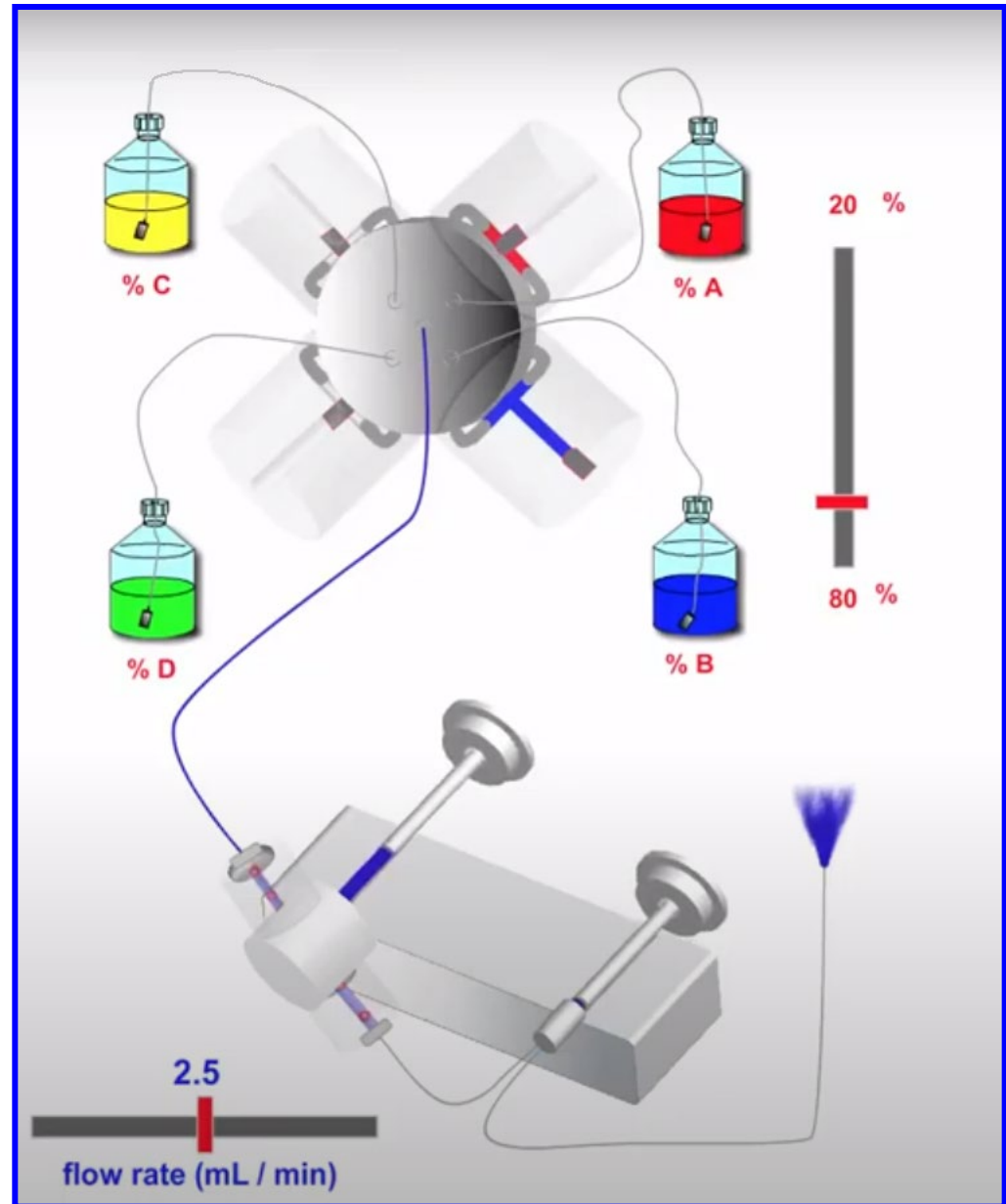
Modalità di esecuzione di un gradiente di eluizione



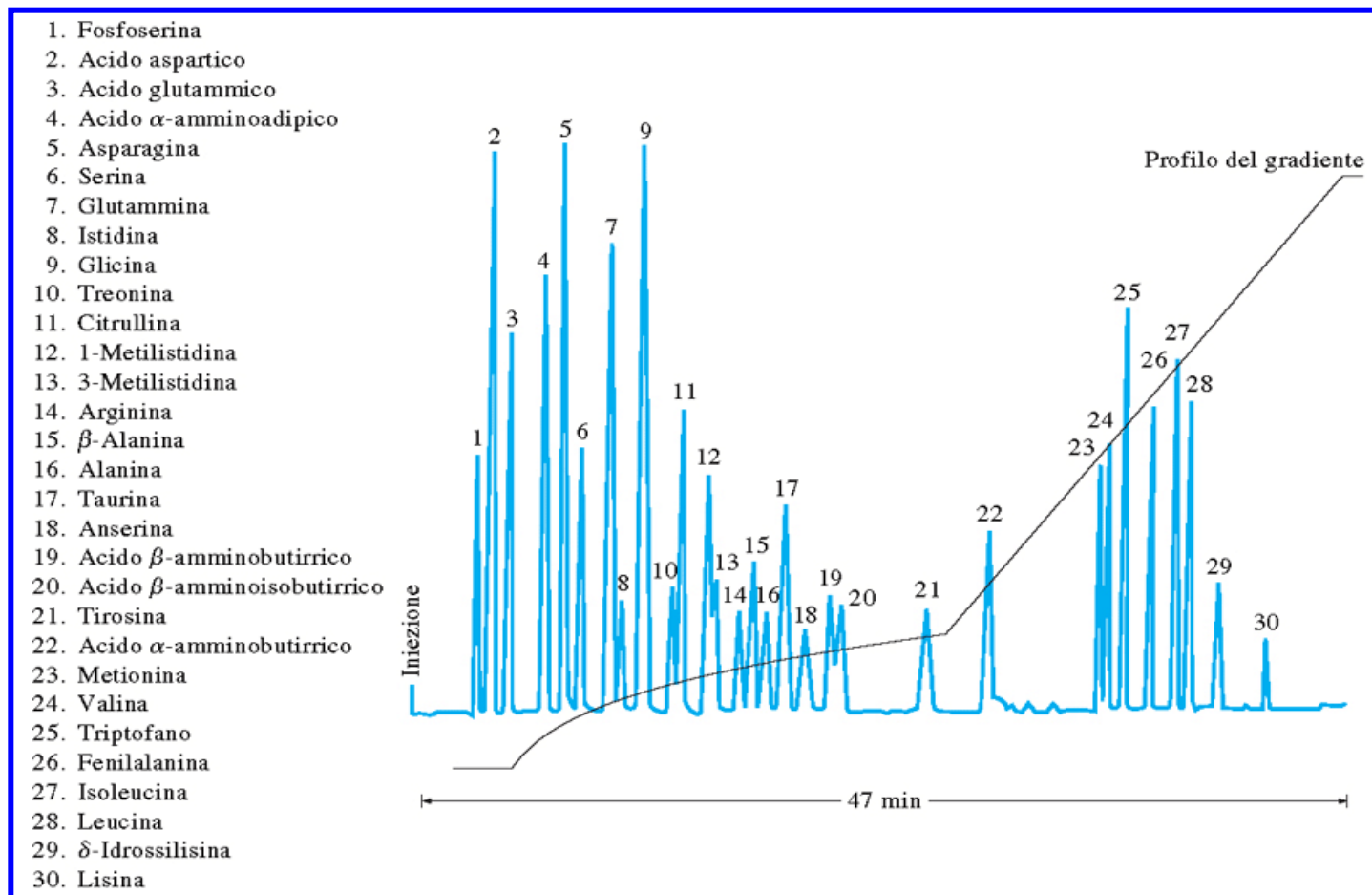
La modalità ad alta pressione richiede tante pompe cromatografiche quanti sono i diversi solventi adoperati per il gradiente, quindi è più laboriosa e costosa.

In questa immagine, tratta da un'animazione, il primo pistone di una pompa a doppio pistone reciprocante sta aspirando il solvente contenuto nella camera interna della valvola di mescolamento (mentre il secondo pistone sta completando il ciclo di compressione).

Nel momento rappresentato dalla figura, inoltre, la connessione fra valvola e bottiglia di solvente blu è aperta, mentre quelle collegate alle altre riserve sono chiuse. La connessione al solvente blu resterà aperta per 4/5 del tempo necessario per riempire la camera interna della valvola, mentre per 1/5 si aprirà la connessione al solvente rosso. Nella camera si creerà quindi una composizione 80% blu e 20% rosso.



Un esempio raffinato di RPC a gradiente di eluizione



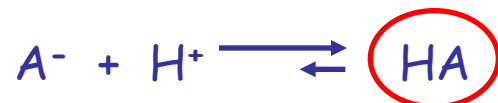
Il profilo indica la variazione della percentuale di acetonitrile nella miscela con acqua usata come fase mobile. Il gradiente consente un'eluizione in tempi ragionevoli e con buona risoluzione anche degli aminoacidi meno polari.

RPC con analiti ionici o ionizzabili

Analiti ionici o ionizzabili possono essere separati e analizzati con la cromatografia di ripartizione in fase inversa purché la loro carica sia soppressa preventivamente.

Soppressione per effetto del pH

- ❖ **Analiti debolmente acidi:** l'uso di fasi mobili tamponate a $\text{pH} < \text{pK}_a$ consente di far prevalere la forma indissociata, ossia non ionica, in colonna:



- ❖ **Analiti debolmente basici:** l'uso di fasi mobili a $\text{pH} > \text{pK}_b$ consente di far prevalere la forma non protonata in colonna



Per colonne RPC a fase legata il pH dev'essere però mantenuto nell'intervallo 2-8 per evitare l'idrolisi acida o basica dei legami silossanici presenti nella fase legata.

Formazione di coppie ioniche (cromatografia in fase inversa a coppia ionica, RP-IPC)

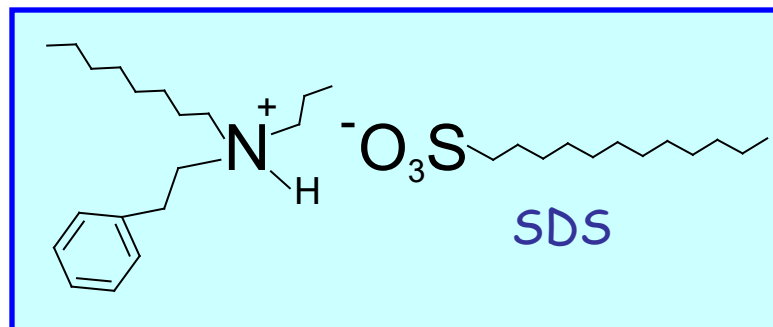
Gli ioni associati ad acidi o a basi forti possono essere soppressi formando **coppie ioniche con opportuni controioni** aggiunti alla fase mobile (concentrazioni tipiche 0.005-0.02 M):

Natura dell'analita	Analiti tipici	Controioni
Cationica	$^+\text{NH}_3\text{R}$, $^+\text{NH}_2\text{R}_2$ $^+\text{NHR}_3$, $^+\text{NR}_4$, $^+\text{NR}_3\text{Ar}$	$\text{R}'\text{SO}_3^-$ $\text{Ar}'\text{SO}_3^-$
Anionica	RSO_3^- , RCOO^-	$^+\text{N}(\text{CH}_3)_4$ $^+\text{N}(\text{C}_4\text{H}_{11})_4$

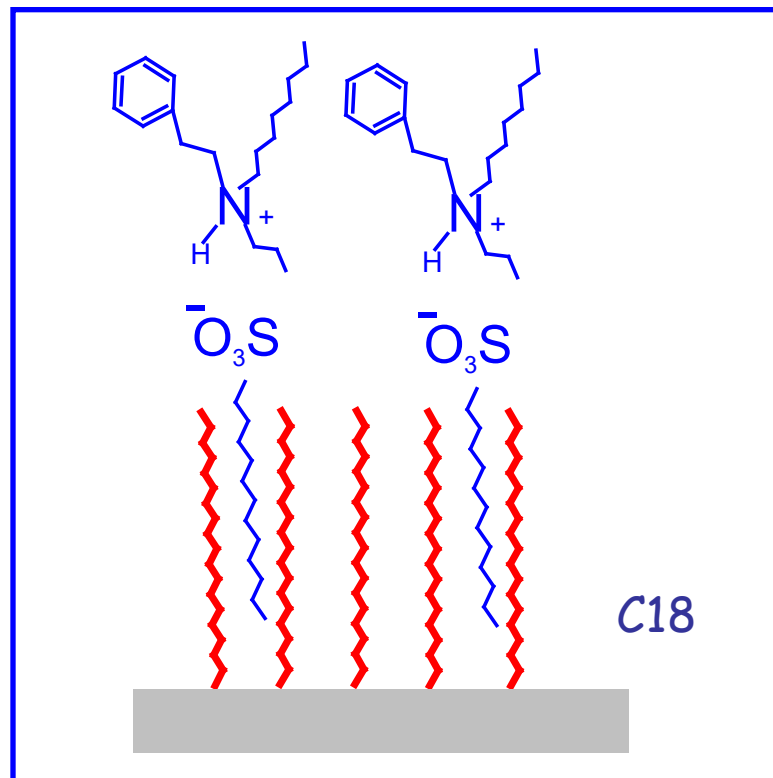
I gruppi R e Ar rappresentano strutture alchiliche o ariliche che sporgono all'esterno della struttura delle coppie ioniche e possono interagire con la fase stazionaria apolare.

Un **esempio di coppia ionica**:

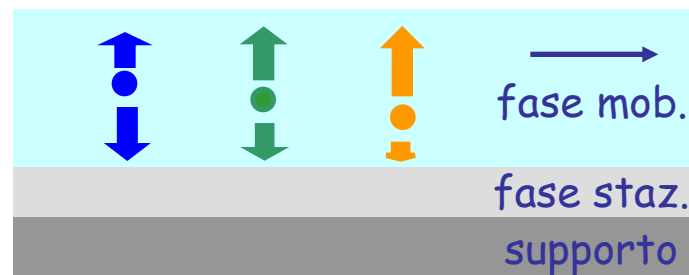
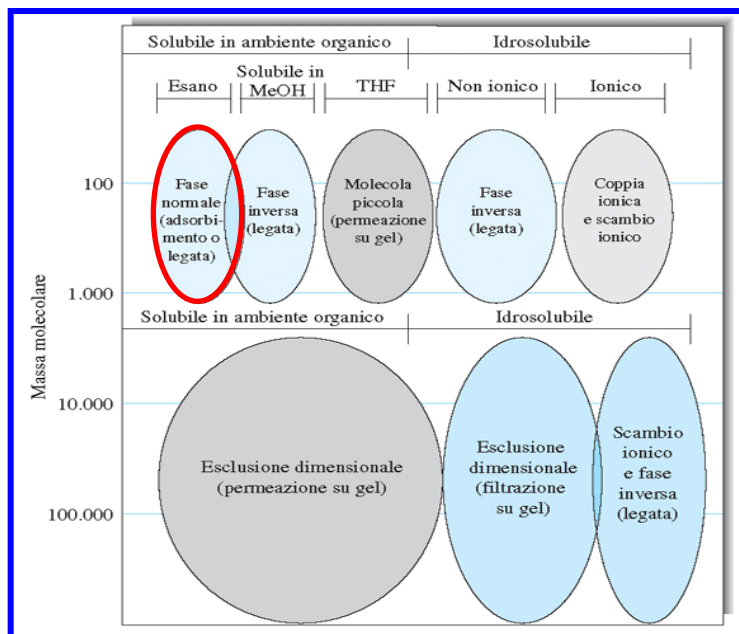
un analita del tipo $^+NHRR'Ar$
accoppiato con una molecola di
sodio dodecil solfato (SDS)



Dopo l'accoppiamento può avvenire
la ritenzione con una tipica fase
stazionaria per RPC, la C18,
mediante l'interazione fra i gruppi
ottadecilici della fase stazionaria e
quelli dodecilici dell'SDS (oppure
uno dei gruppi alchilici/arilici
dell'analita):



Cromatografia liquida di adsorbimento (o liquido-solido, LSC)



La ritenzione in colonna di ciascun analita dipende dal suo **adsorbimento sulla superficie della fase stazionaria**.

Fasi stazionarie tipiche: silice (SiO_2) e allumina (Al_2O_3)

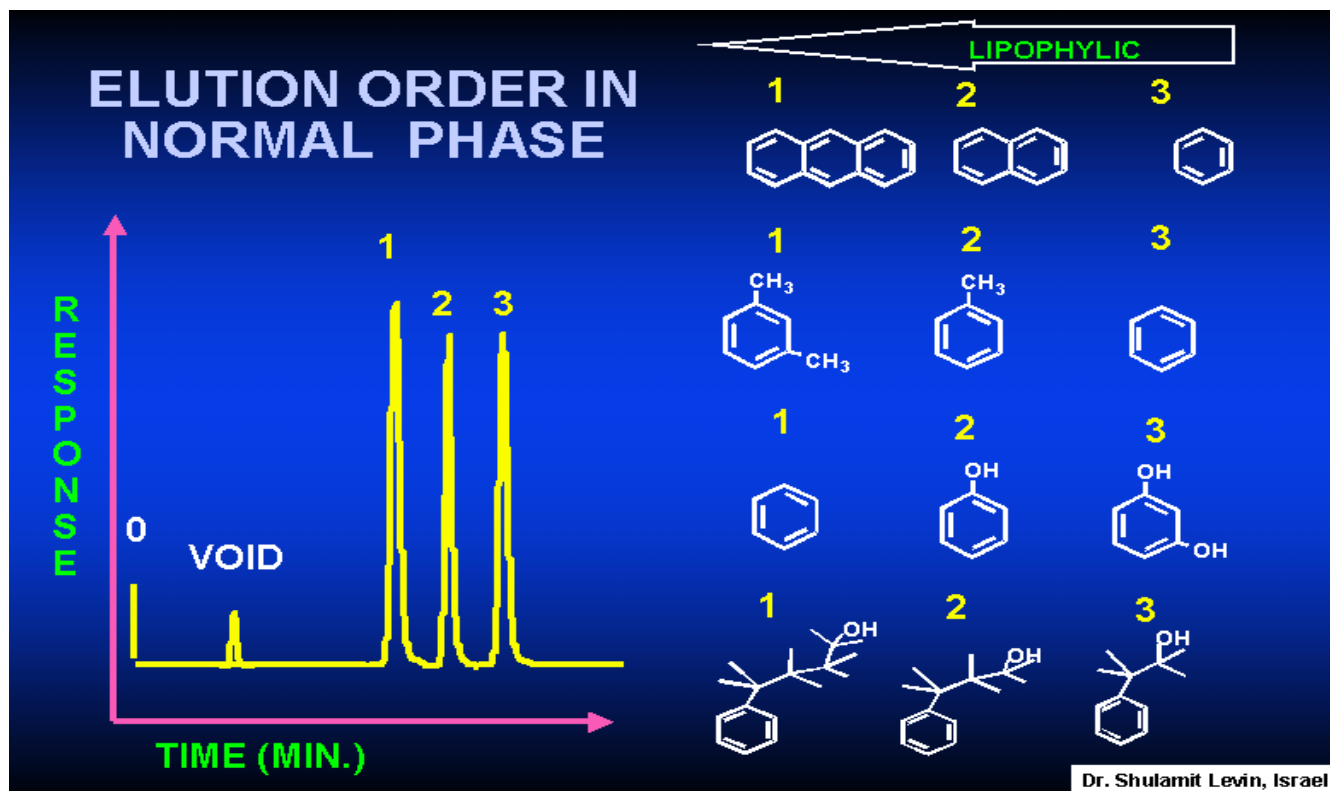
Ordine di eluizione generale per composti organici:

alcheni-idrocarburi aromatici-alogenuri, solfuri-eteri-nitroderivati-esteri, aldeidi, chetoni - alcoli, ammine- solfoni - solfossidi - ammidi - acidi carbossilici

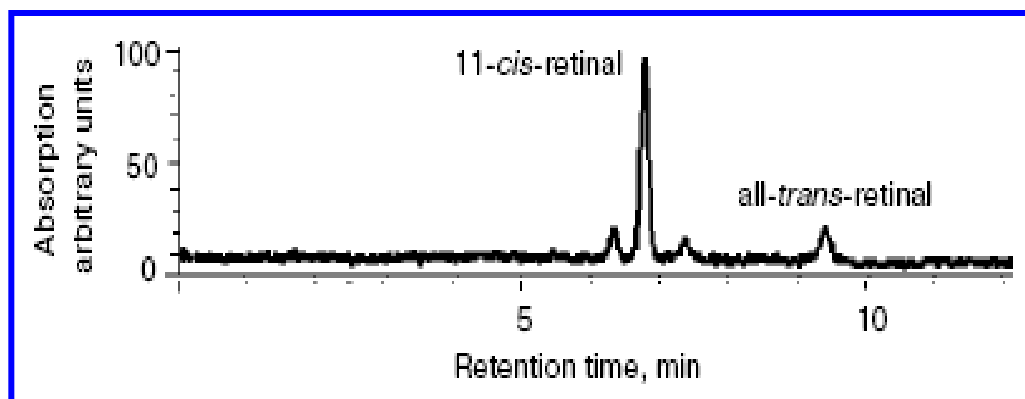
Forza eluente del solvente (ϵ^0): è un indice della capacità del solvente di interagire con gli analiti in modo favorevole rispetto alla fase stazionaria su cui sono adsorbiti.

A seconda dei casi si può usare un solvente apolare (ad esempio l'esano, $\epsilon^0 = 0.01$) o uno abbastanza polare (metanolo, $\epsilon^0 = 0.95$). L'acqua non viene invece usata perché la sua forza eluente è troppo elevata.

La LSC su fase stazionaria polare (NPC) ha la peculiarità di **separare efficacemente composti con notevole somiglianza strutturale:**

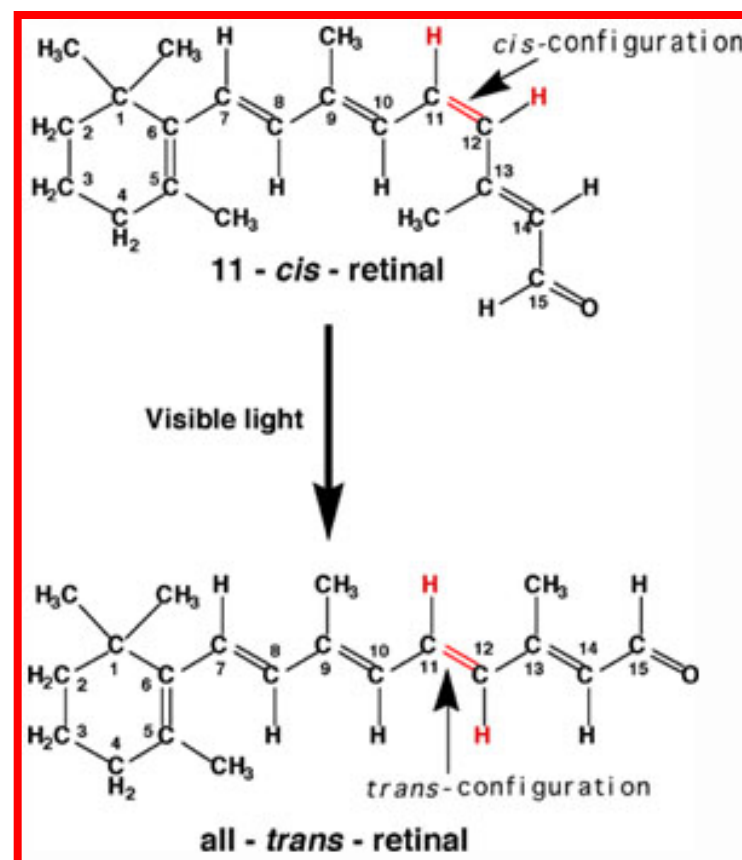


In molti casi la tecnica NPC è in grado di separare composti isomerici, perfino isomeri geometrici, ossia che differiscono unicamente per la configurazione dei legami C=C, come l'11 *cis*-retinale e il retinale completamente *trans*, coinvolti nel meccanismo della visione:

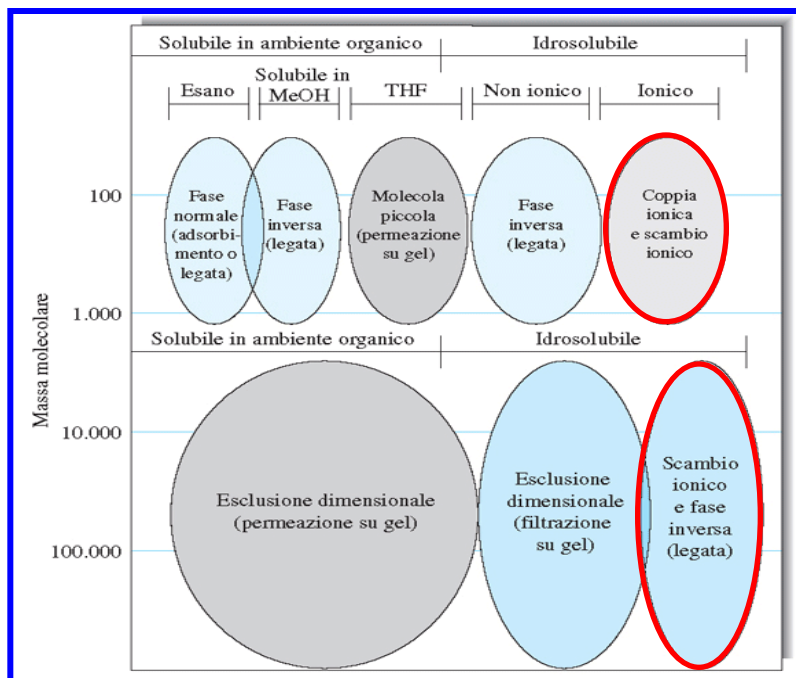


Separazione NPC su una colonna a fase stazionaria silicea con fase mobile costituita da etil acetato in *n*-esano.

Rivelazione spettrofotometrica a 365 nm.



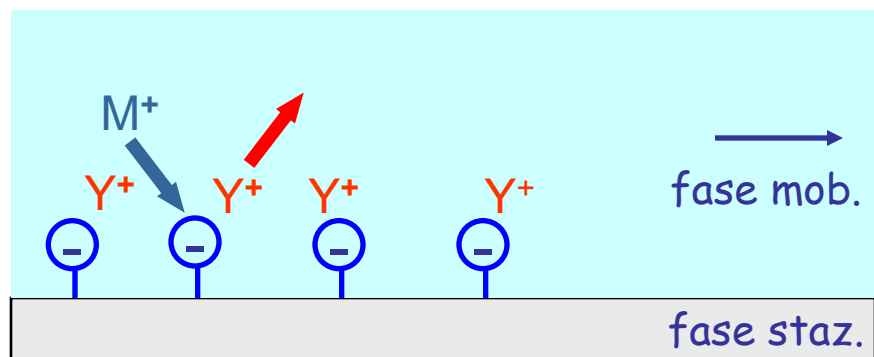
Cromatografia a scambio ionico



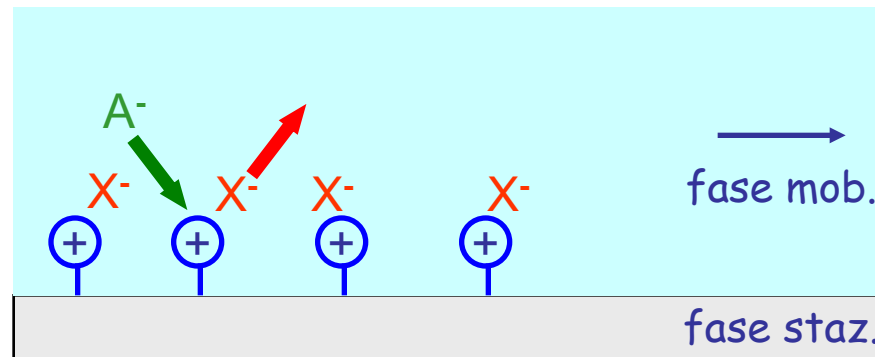
In questo caso gli analiti da separare sono ioni e la diversa ritenzione dipende da **equilibri di scambio** che avvengono in corrispondenza di gruppi ionici presenti sulla fase stazionaria.

Gli analiti con carica e/o dimensioni maggiori tendono ad essere ritenuti più a lungo.

scambio cationico

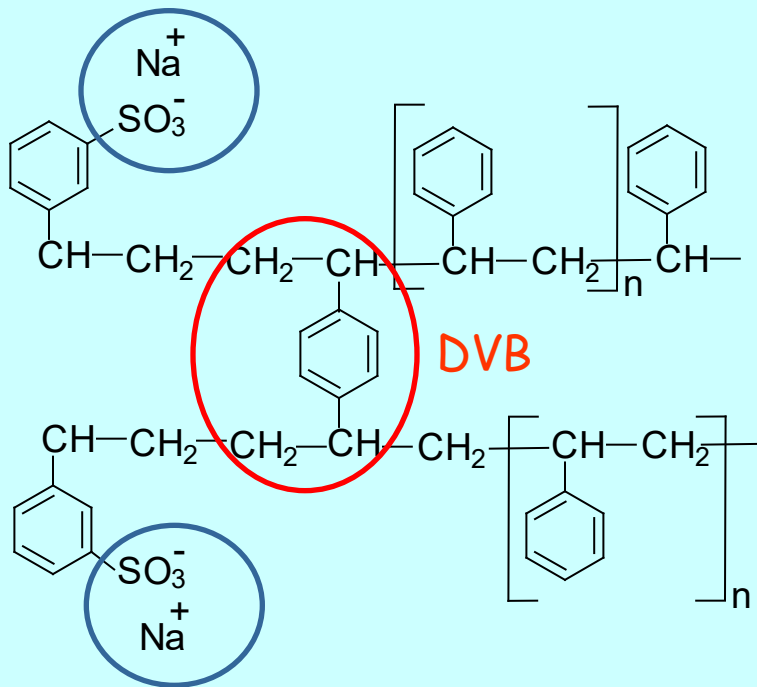


scambio anionico

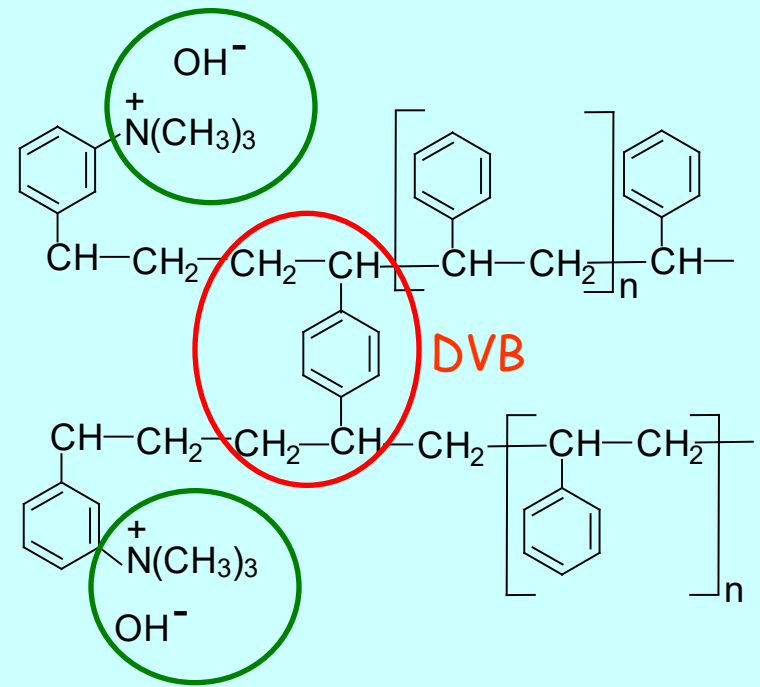


Generalmente le fasi stazionarie sono **copolimeri stirene-divinilbenzene (DVB)** modificati con gruppi scambiatori ionici.

La presenza di **DVB** (4-12 %) determina il grado di reticolazione (e quindi la rigidità e la porosità) della fase stazionaria.

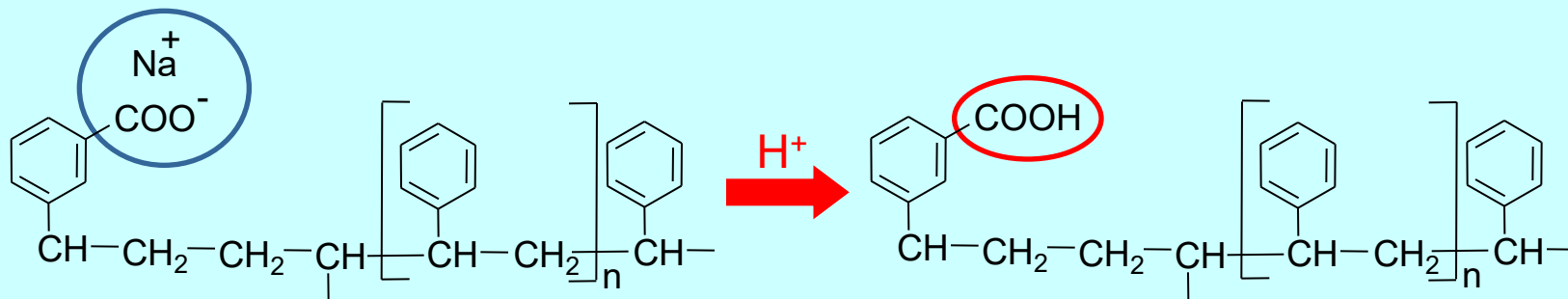


scambiatore cationico "forte"



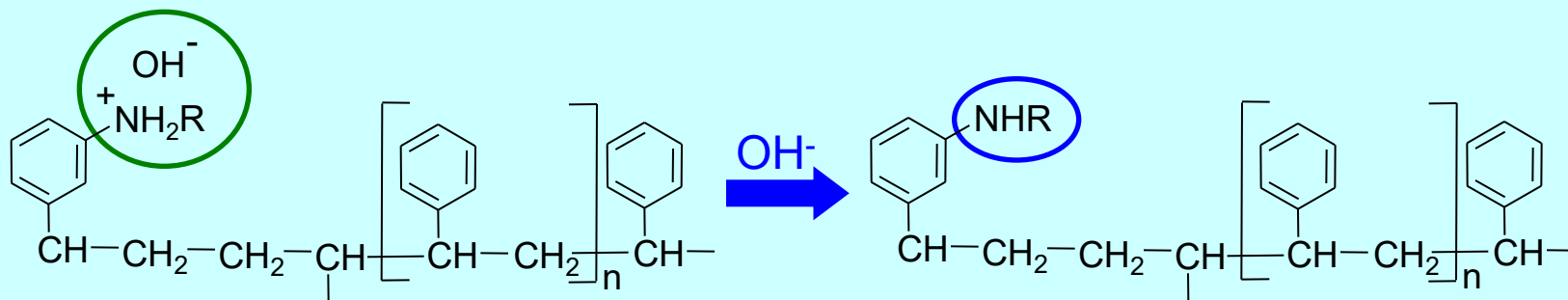
scambiatore anionico "forte"

Gli scambiatori forti possiedono gruppi dotati di carica in qualunque condizione di pH. In alternativa si possono usare **scambiatori deboli**, ad esempio dotati di gruppi $\text{COO}^- / ^+\text{NH}_2\text{R}$, la cui carica può essere soppressa in opportune condizioni di pH (acido/basico rispettivamente).



scambiatore cationico "debole"

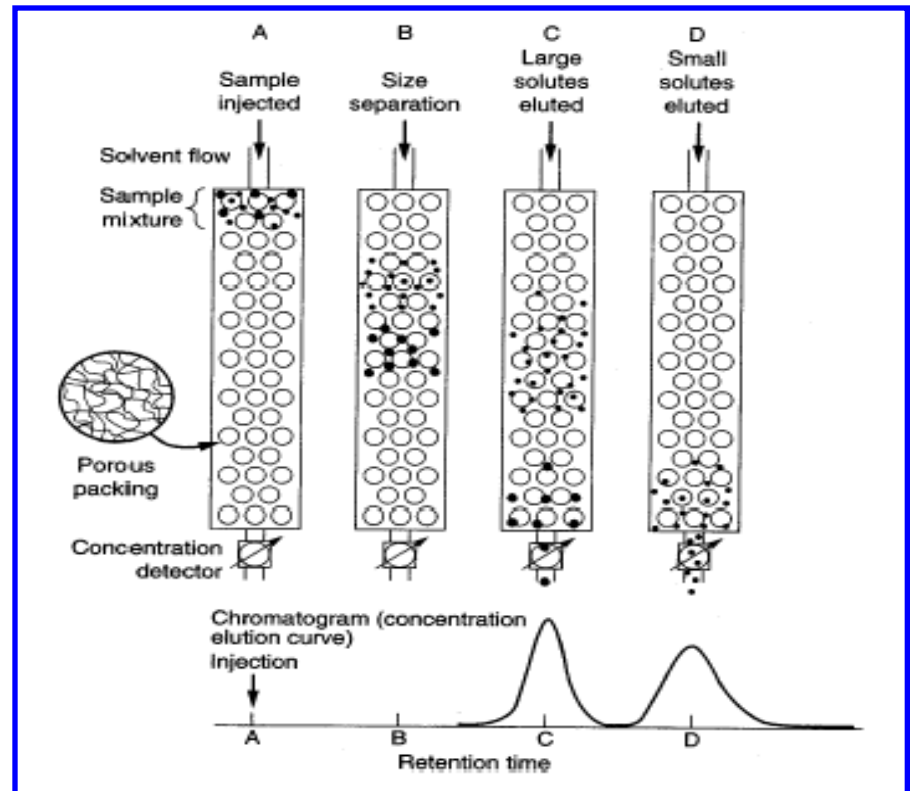
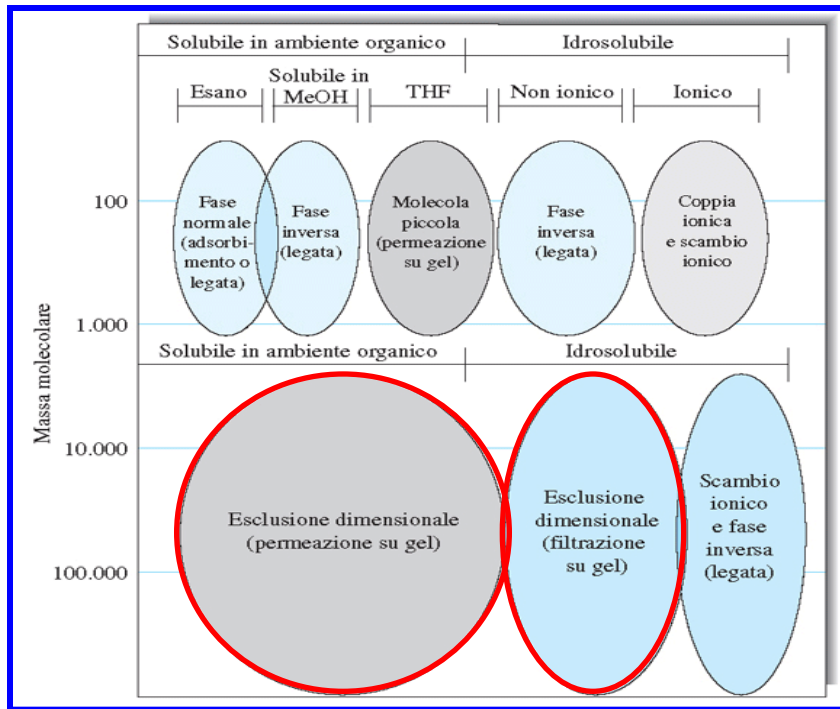
fase stazionaria polare



scambiatore anionico "debole"

fase stazionaria polare

Cromatografia di esclusione dimensionale (SEC)

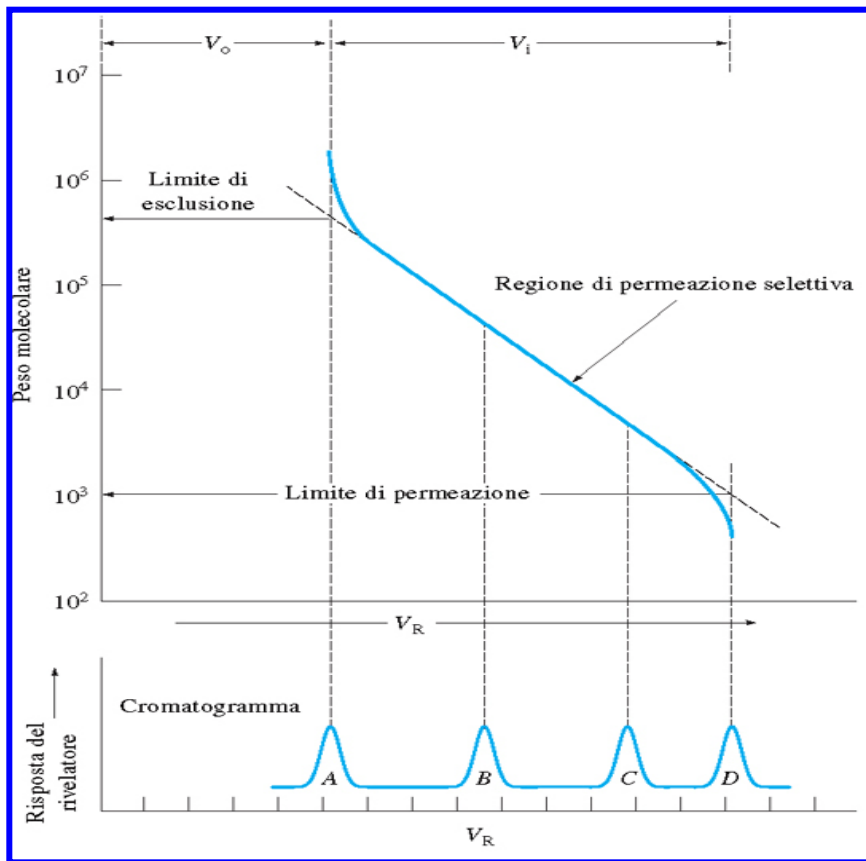


Gli analiti vengono separati in base alle loro dimensioni usando fasi stazionarie costituite da particelle dotate di pori di dimensioni opportune (da 40 a 2500 Å).

Le molecole di grandi dimensioni non riescono a penetrare nei pori e vengono eluite rapidamente, quelle di piccole dimensioni sono ritenute più lungo.

Parametri di una colonna SEC

- ❖ le molecole le cui dimensioni sono superiori a quelle dei pori (non ritenute) eluiscono nel picco del **volume morto (V_0)**
- ❖ le molecole di piccole dimensioni eluiscono al volume $V_0 + V_i$, con V_i = **volume interno ai pori**
- ❖ le molecole di dimensioni intermedie eluiscono al volume V_R = $V_0 + KV_i$ ($K < 1$)



- ❖ **limite di esclusione**: è il peso molecolare oltre il quale non c'è più ritenzione
- ❖ **limite di permeazione**: è il peso molecolare al di sotto del quale non c'è più alcuna differenza nella ritenzione degli analiti

I due limiti per una specifica colonna SEC possono essere stabiliti effettuando una **taratura con analiti di peso molecolare noto**.

Natura della fase stazionaria e metodi SEC

Tipicamente le colonne SEC sono impaccate con particelle (diametro da 5 a 10 μm) di:

silice → SEC a filtrazione su gel, adatta ad analiti solubili in acqua

copolimeri stirene-divinilbenzene → SEC a permeazione su gel, adatta ad analiti solubili in solvente organico.

Tipo	Dimensione delle particelle, μm	Dimensione media dei pori, \AA	Limite di esclusione della massa molecolare*
Polistirene-divinilbenzene	10	100	700
		1000	$(0,1-20) \times 10^4$
		10^4	$(1-20) \times 10^4$
		10^5	$(1-20) \times 10^5$
Silice	10	10^6	$(5->10) \times 10^6$
		125	$(0,2-5) \times 10^4$
		300	$(0,03-1) \times 10^5$
		500	$(0,05-5) \times 10^5$
		1000	$(5-20) \times 10^5$

La cromatografia ad esclusione dimensionale viene impiegata per l'analisi di macromolecole artificiali (**polimeri**) o biologiche (**peptidi, proteine, acidi nucleici**):

