

Appunti di Tecniche avanzate per il controllo degli alimenti

Parte 2

ZEPPA G. – BELVISO S.
Università degli Studi di Torino



La cromatografia

Il termine cromatografia indica un insieme di tecniche che hanno lo scopo di separare una miscela nei suoi componenti, per permetterne il riconoscimento qualitativo e quantitativo. Queste tecniche sono basate sulla distribuzione dei vari componenti fra due fasi, una chiamata fase fissa o fase stazionaria e l'altra chiamata fase mobile o eluente, che fluisce in continuo attraverso la fase fissa.



Il campione è introdotto nella fase mobile, che può essere un gas, un liquido o un fluido supercritico (GC – LC – SFC).

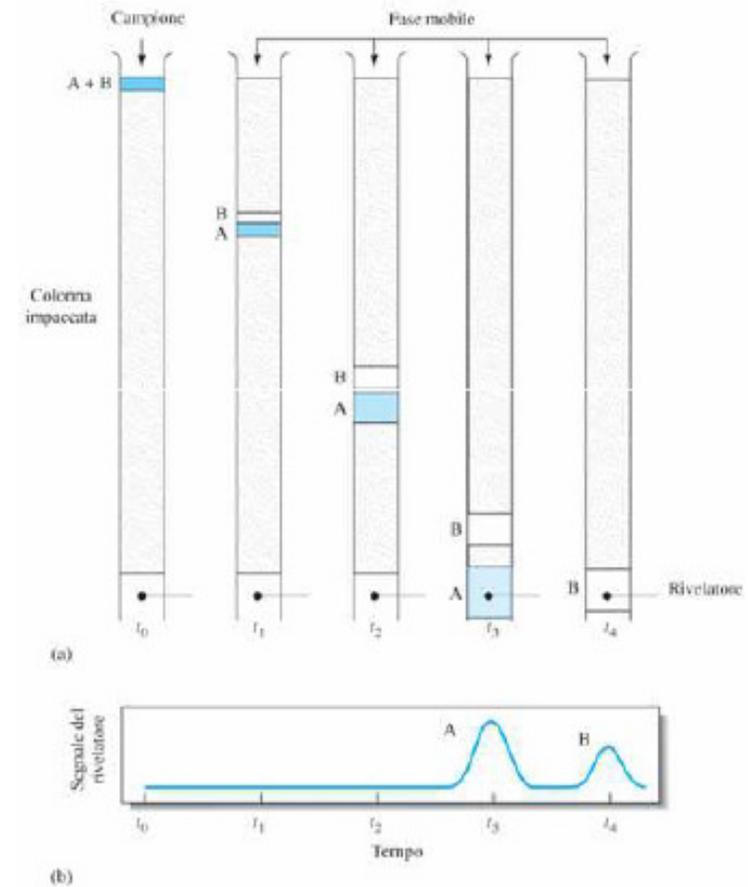
La fase mobile viene fatta eluire in continuo attraverso la fase stazionaria, che deve essere immiscibile nell'eluente.

La fase stazionaria (liquida o solida) si trova all'interno di una colonna oppure è supportata su una superficie piana (su colonna – planare).

La separazione dei componenti avviene in quanto ogni sostanza ha una distribuzione caratteristica tra le due fasi (costante di ripartizione $K_d = C_s/C_m$).

Ponendo all'uscita della colonna un rivelatore che misuri la concentrazione del soluto nell'eluato e riportando il segnale in funzione del tempo si può ottenere un cromatogramma.

La posizione dei picchi sull'asse dei tempi, o tempo di ritenzione, serve per identificare i componenti del campione. L'area sottesa dai picchi è proporzionale alla quantità di ogni singolo componente e può essere utilizzata a scopo quantitativo.

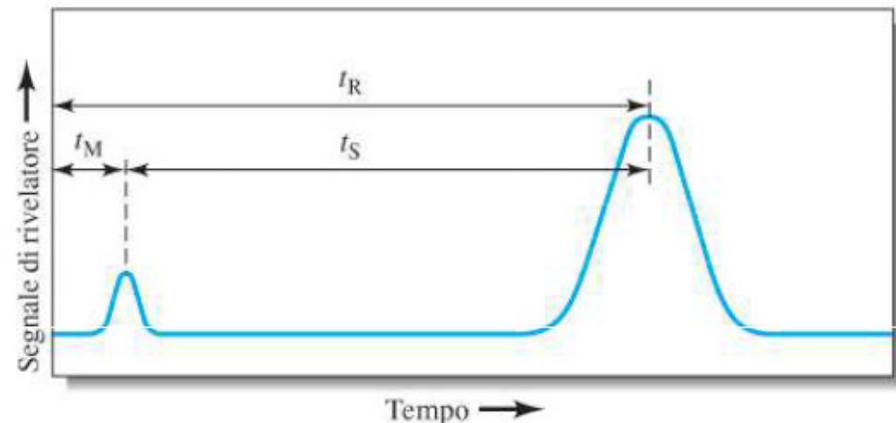


FATTORE DI CAPACITA'

Fattore di capacità k' = $(T_r - T_0)/T_0$: fornisce una misura dell'interazione di un soluto con la fase stazionaria ($> \text{è } k' > \text{è il tempo trascorso dall'analita nella colonna}$).

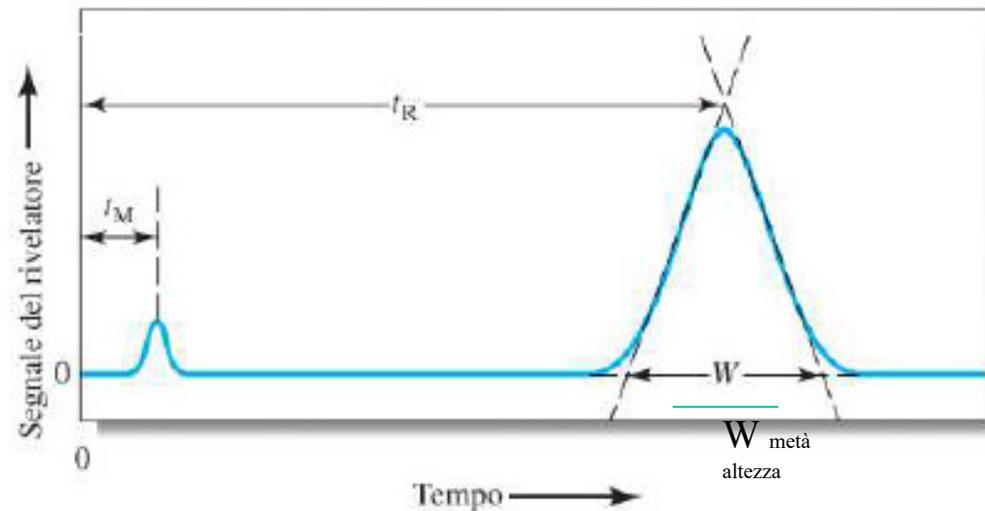
Il tempo di ritenzione T_r è il tempo che impiega un componente della miscela iniettata ad uscire dalla colonna o, tecnicamente, ad essere rivelato come picco dal detector. Nella figura sottostante è rappresentato un cromatogramma:

- il picco a sinistra rappresenta un soluto che non ha alcuna interazione con la fase stazionaria ed esce al cosiddetto tempo zero, T_0
- il picco a destra rappresenta un soluto che ha, invece, interazione con la fase stazionaria ed esce al tempo $T_r > T_0$



EFFICIENZA

È la capacità del sistema di produrre picchi stretti. È rappresentata numericamente dal numero di piatti teorici (si assume che la colonna cromatografica sia composta da una serie di strati sottili chiamati piatti teorici, come in una colonna di distillazione, in ognuno dei quali si realizza un singolo stadio di equilibrio). Se il picco è simmetrico $N=5.54 \left(\frac{t_R}{W_{\text{metà}} \text{ altezza}} \right)^2$

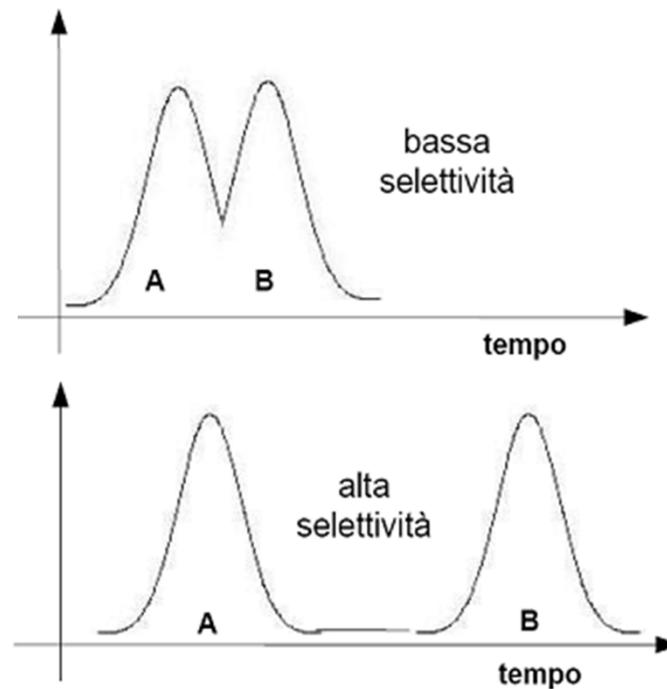


SELETTIVITA'

È la capacità del sistema di differenziare il comportamento cromatografico di due analiti.
Il comportamento cromatografico dell'analita è descritto da k' (equilibrio dell'analita tra fase mobile e fase stazionaria)

α (selettività) = k'_2/k'_1 (fattori di capacità di due analiti)

Se $\alpha = 1$ i due analiti si sovrappongono (coeluiscono)

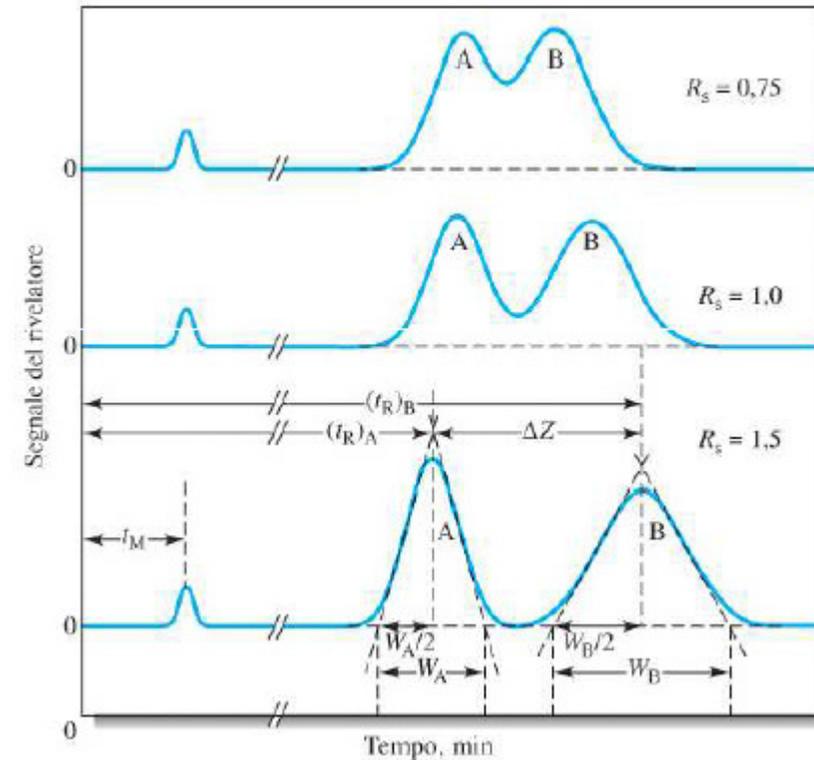


RISOLUZIONE

È l'obiettivo della cromatografia; è la capacità del sistema di separare due picchi cromatografici.

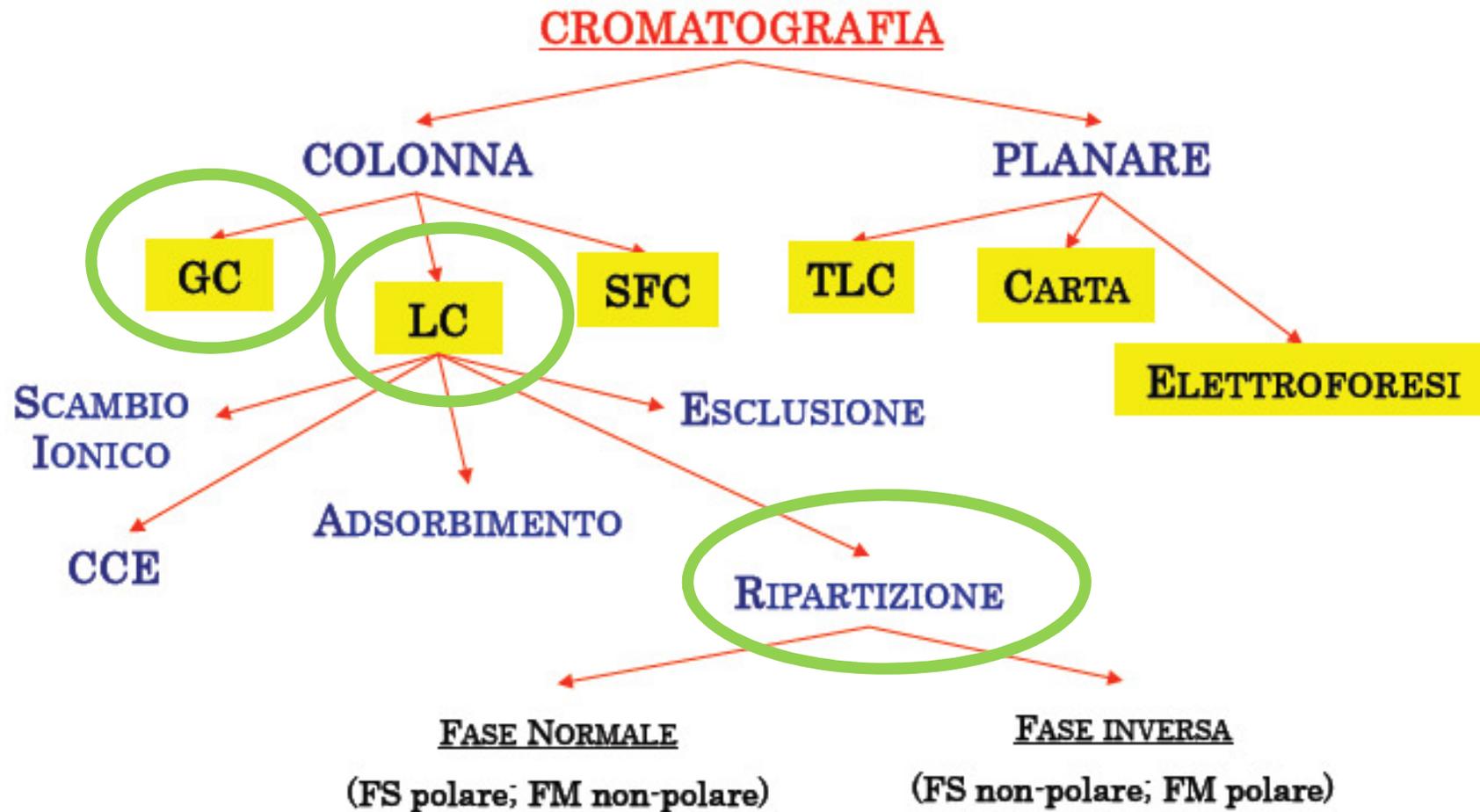
$$R_s (\text{risoluzione}) = (T_{R2} - T_{R1}) / 0,5 (w_1 + w_2)$$

w = ampiezza del picco alla base



Equazione fondamentale della cromatografia; collega l'obiettivo della cromatografia alle 3 variabili fondamentali (fattore di capacità k' ; efficienza N ; selettività α).

$$R = (\sqrt{N}/4) (\alpha - 1) (k' / (1 + k')) \quad 2 < k' < 10$$



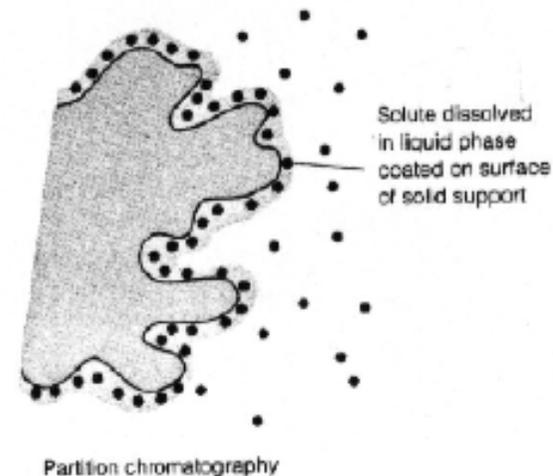
CCE = CROMATOGRAFIA CAPILLARE DI ELETTROFORESI

RIPARTIZIONE

Tra due fasi: la **fase stazionaria** e la **fase mobile** (devono invece essere immiscibili).

Durante l'eluizione le molecole si ripartiscono dinamicamente tra le due fasi secondo la diversa solubilità di ognuna. Si parla quindi di **cromatografia di ripartizione**, che può essere gas-liquido o liquido-liquido a seconda della natura della fase mobile.

La cromatografia di ripartizione è chiamata in **FASE NORMALE** se la fase stazionaria è più polare della fase mobile, mentre è chiamata **FASE INVERSA** se la fase stazionaria è meno polare della fase mobile. Si tratta della tecnica più comunemente impiegata per la separazione di analiti.

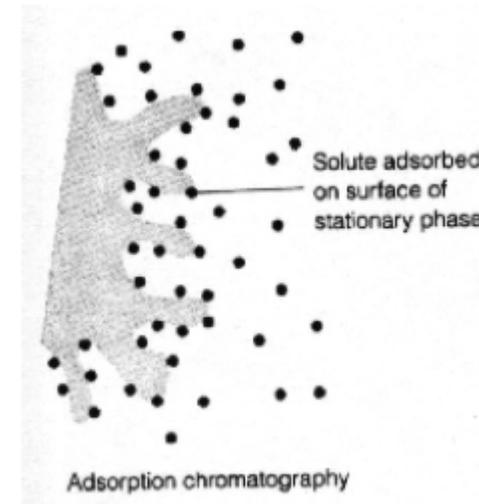


ADSORBIMENTO

La fase stazionaria è un solido in polvere steso su un supporto; sulla superficie dei granuli si trovano siti attivi che possono stabilire legami deboli (reversibili!) con le molecole della miscela da separare.

Si parla quindi di cromatografia di adsorbimento, che può essere gas-solido o liquido-solido a seconda della natura della fase mobile.

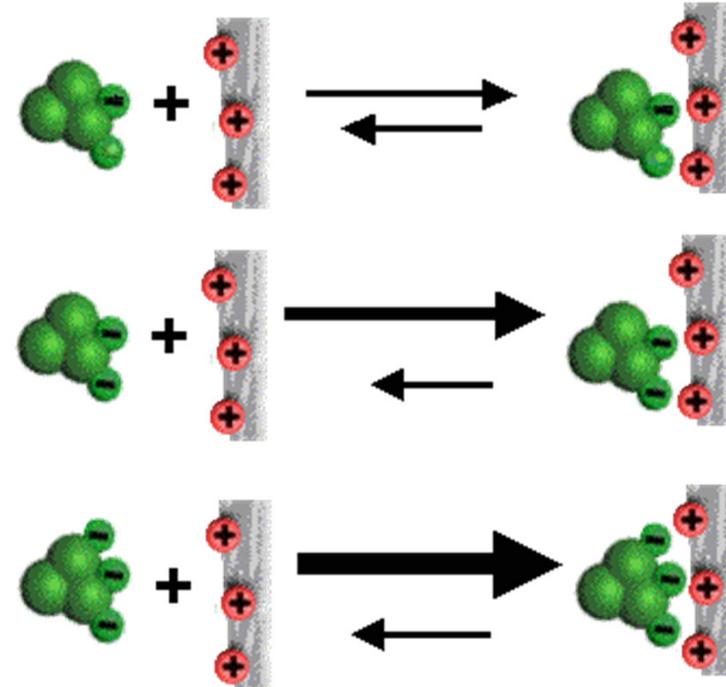
La cromatografia di adsorbimento è utilizzata per separare sostanze neutre polari o non polari, di natura organica o inorganica.

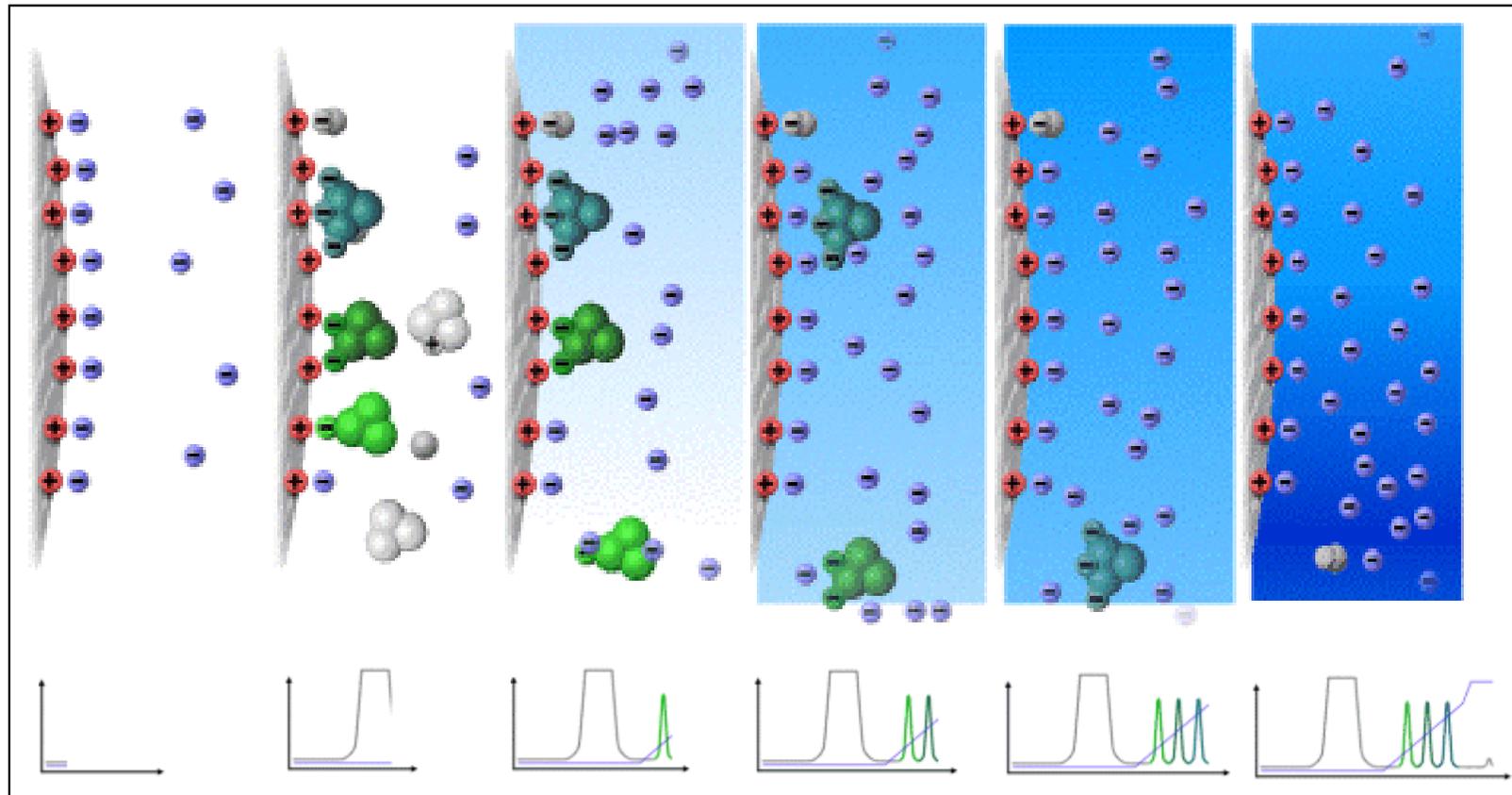


SCAMBIO IONICO

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

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

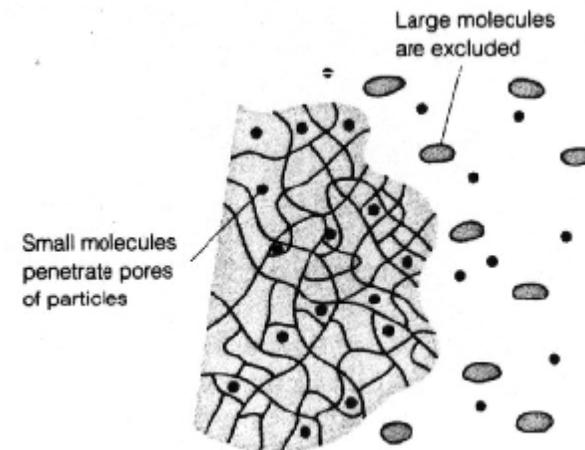




ESCLUSIONE DIMENSIONALE

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

Si parla di cromatografia di esclusione dimensionale con le varianti gel permeazione per la separazione di sostanze insolubili in acqua e gel filtrazione per la separazione di sostanze solubili in acqua. La tecnica è impiegata per la separazione di molecole di grandi dimensioni.



Molecular exclusion chromatography