



CHIMICA BIOANALITICA

a.a 2023/24

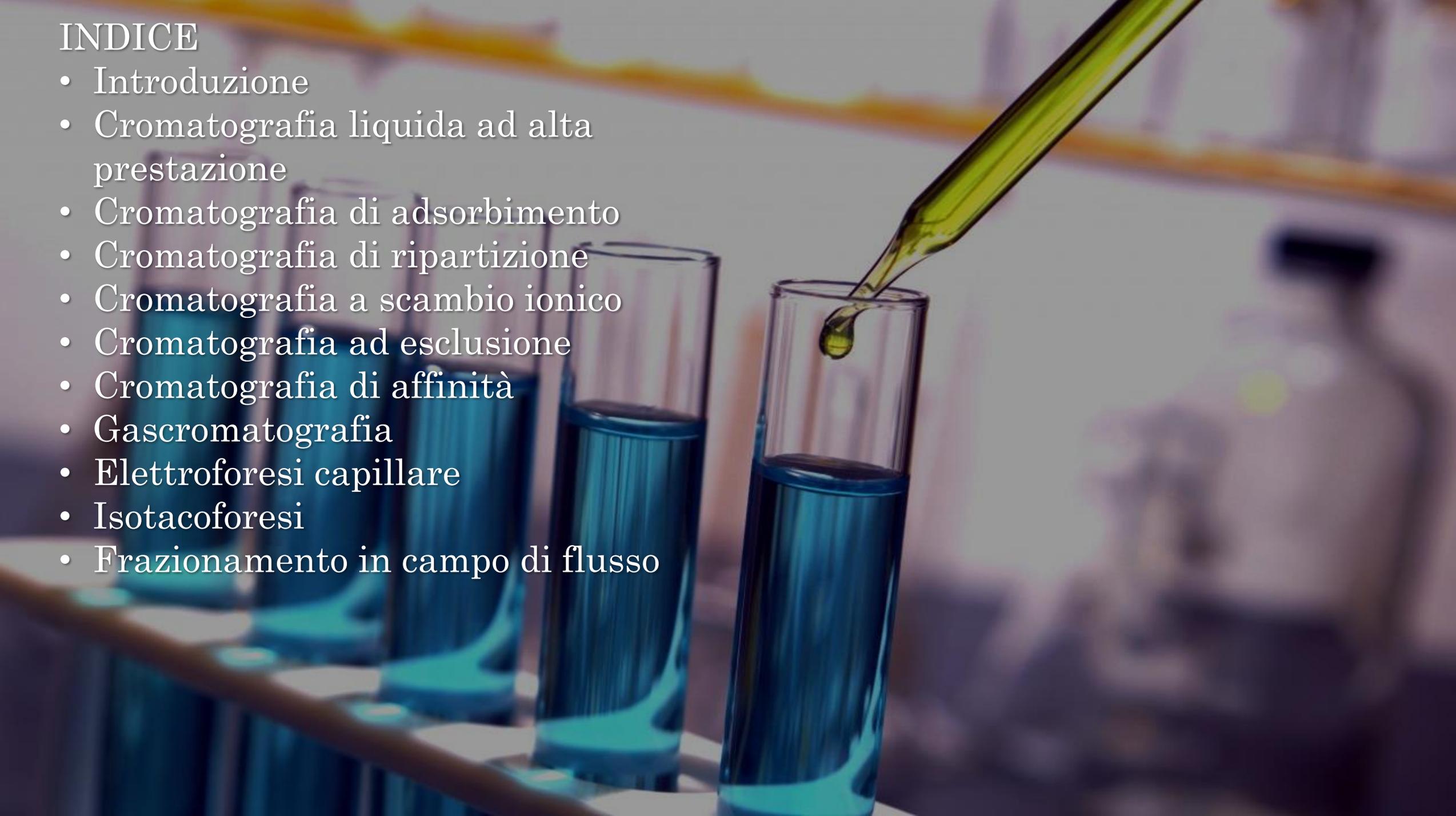
SEPARAZIONI ANALITICHE

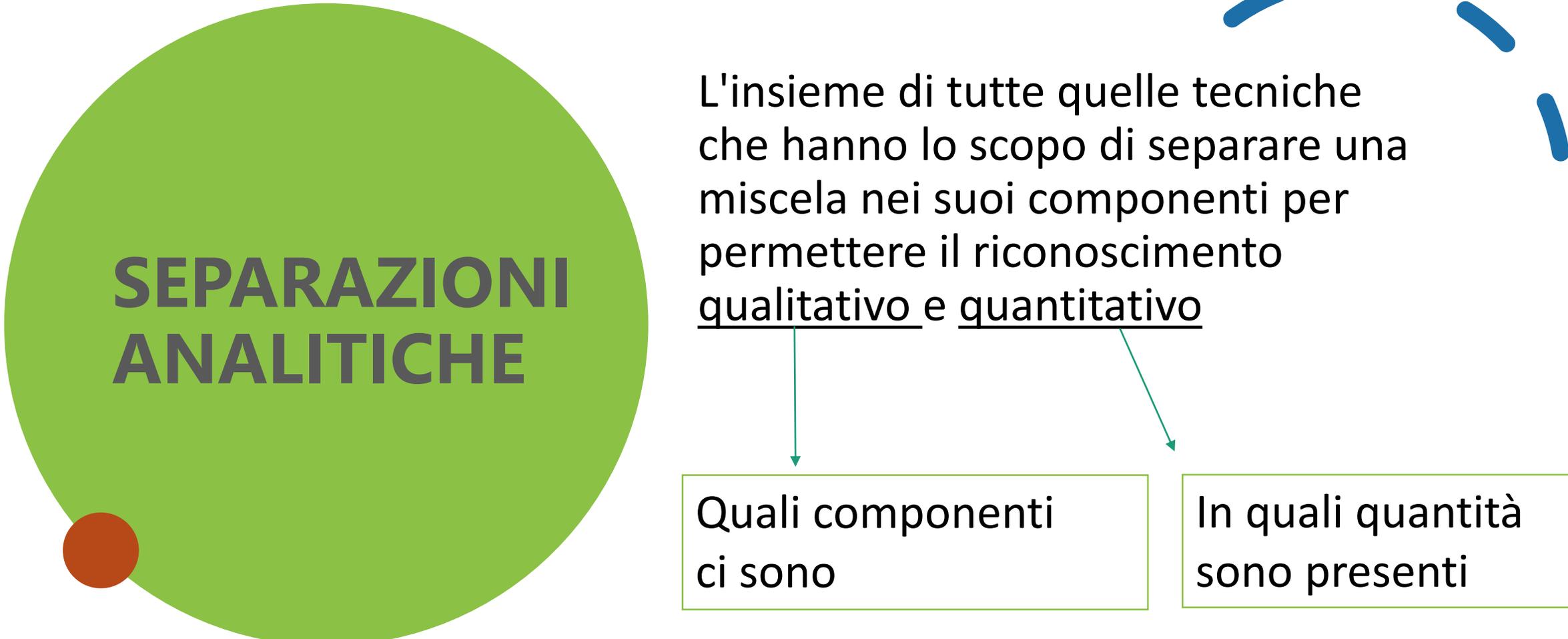
DOCENTE: PROF.SSA ELENA CHIANESE

CRISTIANA CACACE 0123002870
DANILO ZERILLO 0123002824
ROSSELLA FARINA 0123002747
SABRINA CIMMINO 0123002839
SIMONA STEFANELLI 0123002843
LORENZA CHIOLA 0123003114
SERENA SOMMELLA 0123002795

INDICE

- Introduzione
- Cromatografia liquida ad alta prestazione
- Cromatografia di adsorbimento
- Cromatografia di ripartizione
- Cromatografia a scambio ionico
- Cromatografia ad esclusione
- Cromatografia di affinità
- Gascromatografia
- Elettroforesi capillare
- Isotacoforesi
- Frazionamento in campo di flusso





SEPARAZIONI ANALITICHE

L'insieme di tutte quelle tecniche che hanno lo scopo di separare una miscela nei suoi componenti per permettere il riconoscimento qualitativo e quantitativo

Quali componenti
ci sono

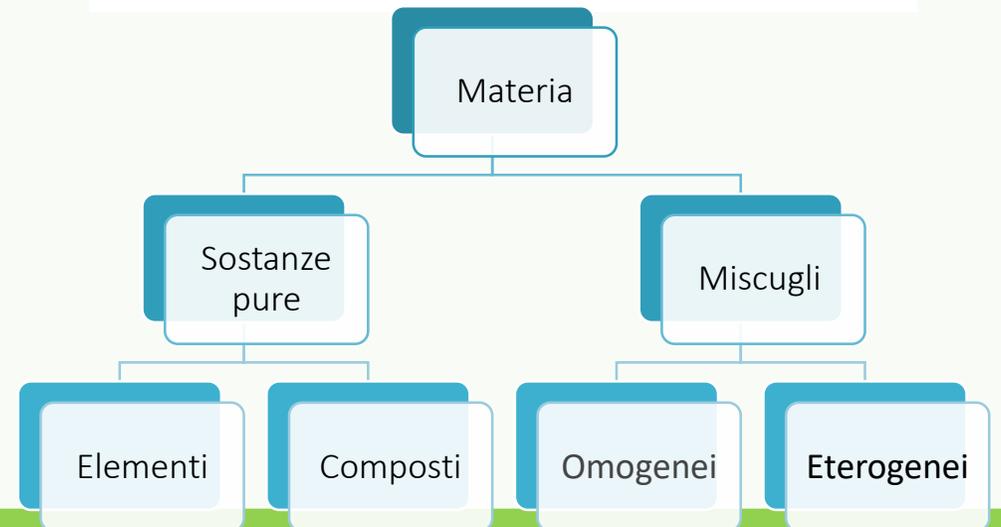
In quali quantità
sono presenti

LA MATERIA

La materia è tutto ciò che occupa uno spazio e possiede una massa.
Essa esiste in tre stati di aggregazione e può cambiare il suo stato fisico attraverso opportune variazioni di temperatura e pressione.

La materia può presentarsi sottoforma di sostanze pure o miscugli.

Gli elementi sono formati da atomi dello stesso tipo e non possono essere scomposti in specie più semplici.



MISCUGLIO

In chimica per miscuglio si intende un insieme di più sostanze, dove le singole sostanze che la compongono, mantengono inalterate le loro proprietà chimiche che hanno allo stato isolato

OMOGENEA

Sistemi costituiti da due o più sostanze che si mescolano in maniera uniforme a livello molecolare. Abbiamo un'unica fase



ETEROGENEA

È costituita da componenti visibilmente diversi che non sembrano essere mescolati tra di loro. Abbiamo più fasi



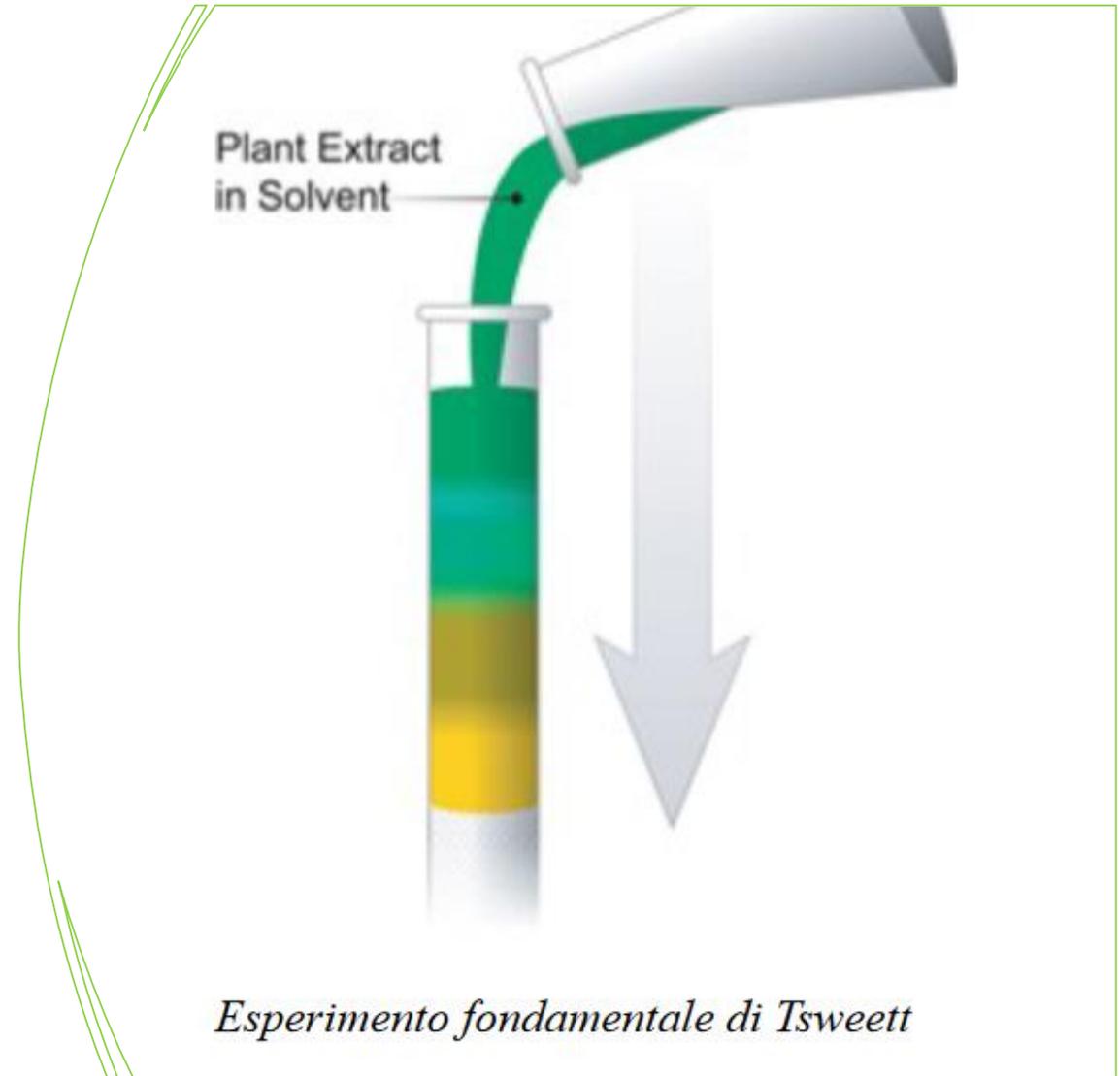
Metodi di separazione

Metodo	Base del Metodo
Separazione in fase Meccanica <ul style="list-style-type: none">• Filtrazione• Decantazione• Centrifugazione• Cristallizzazione• Estrazione con solvente• Distillazione	Diversa dimensione Diversa densità Diversa densità Diversa solubilità Diversa solubilità Diversa volatilità
Cromatografia	Differenza di mobilità delle componenti di una miscela tra due fasi.
Elettroforesi	Differenza nella velocità di migrazione delle specie cariche in un campo elettrico
Frazionamento in campo Flusso	Differenza nell'interazione con un campo o un gradiente applicato perpendicolarmente alla direzione di trasporto

Cromatografia: cenni storici



- Botanico russo Tswett
- Inizi del '900
- Colonna: carbonato di calcio con pigmenti
- Miscela: alcol etilico ed etere di petrolio
- Le diverse componenti raggiungono il fondo della colonna con modalità e tempistiche diverse



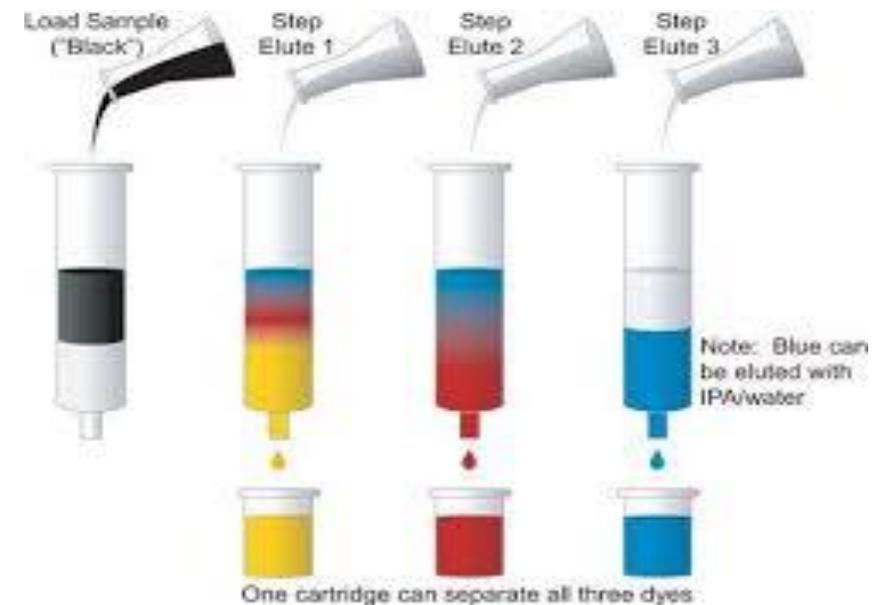
CROMATOGRAFIA

La cromatografia, in generale, può essere definita come una tecnica di separazione basata sulla diversa velocità di migrazione con cui più sostanze depositate su un supporto, che può essere di diverso tipo in base alla tecnica cromatografica che stiamo andando ad utilizzare, vengono trasportate da un fluido detto eluente e si stratificano in posizioni differenti sul supporto.



FASE STAZIONARIA

FASE MOBILE



Classificazione metodi cromatografici

- Stato fisico della fase mobile
- Forma del supporto cromatografico
- Meccanismo di separazione

<i>Fase Mobile</i>	<i>Strumentazione</i>	<i>Principi di separazione</i>	<i>Tecnica</i>
Liquida	Colonna	Ripartizione	LLC cromatografia liquido/liquido
		Adsorbimento	LSC cromatografia liquido/solido
		Scambio ionico	IEC cromatografia a scambio ionico
		Esclusione	GPC cromatografia a permeazione di gel
	Strato sottile	Ripartizione	TLC cromatografia su strato sottile
		Adsorbimento	TLC cromatografia su strato sottile
Cromatografo liquido	Scambio ionico	TLIEC cromatografia scambio ionico su strato sottile	
	Ripartizione	HPLC cromatografia ad alte prestazioni	
Gassosa	Gascromatografo	Ripartizione	GLC cromatografia liquido/gas
		Assorbimento	GSC cromatografia liquido/solido

Modalità di attrazione dell'analita per la fase stazionaria

- ADSORBIMENTO
- RIPARTIZIONE
- SCAMBIO IONICO
- ESCLUSIONE
- AFFINITA'

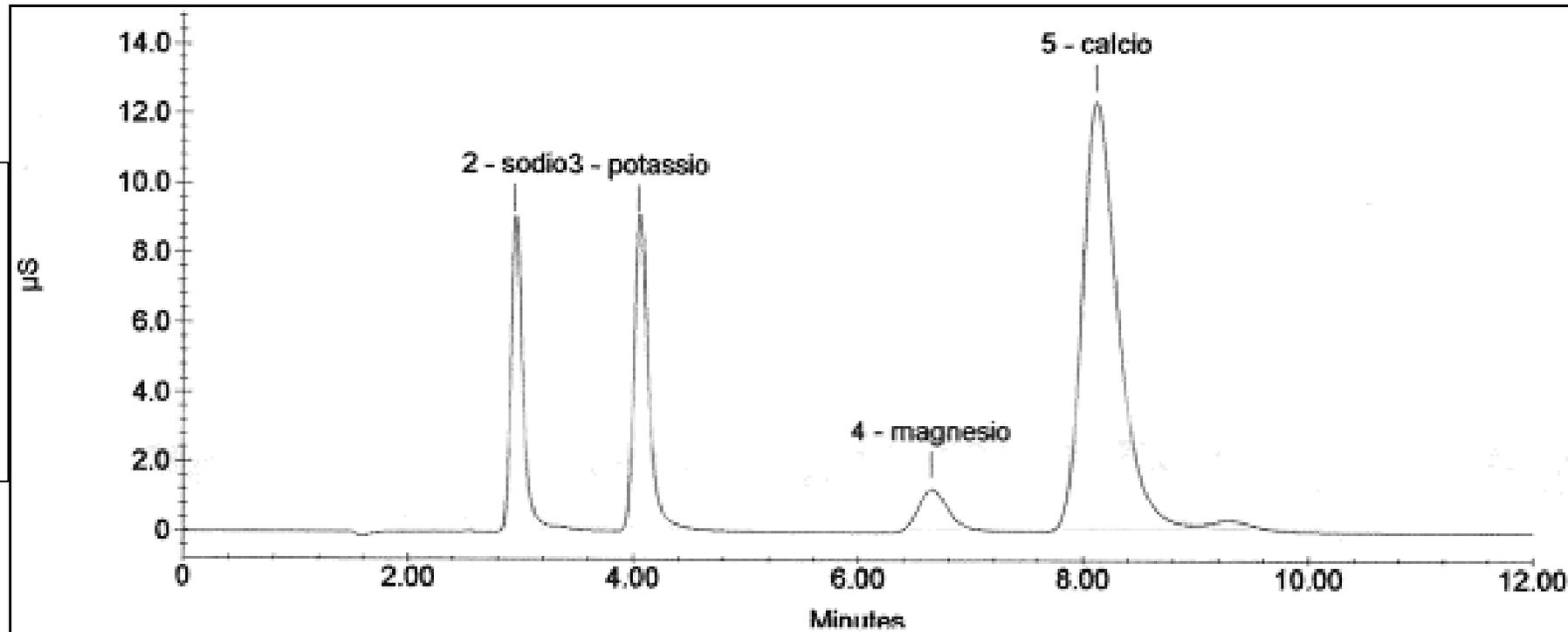
FASI CROMATOGRAFIA

- Eluizione della miscela con la fase mobile attraverso la fase stazionaria
- Separazione dei componenti in base all'eluizione
- Rivelazione dei composti separati

Cromatogramma

Rappresentazione grafica dei risultati ottenuti da un esperimento di **cromatografia**. In pratica, il cromatogramma mostra la **distribuzione dei componenti del campione in base al tempo di ritenzione (o al volume di eluizione)** durante l'analisi cromatografica.

Intensità del **segnale**, correlato alla **quantità** di sostanza rilevata



Tempo di eluizione

Coefficiente di ripartizione

Spesso indicato con il simbolo **K**, è una **misura** che indica come un **componente del campione si distribuisce** tra la **fase mobile** e la **fase stazionaria**.

Il coefficiente di ripartizione viene calcolato come il **rapporto delle concentrazioni del componente tra la fase mobile e la fase stazionaria**.

- Un **coefficiente** di ripartizione **appropriato** contribuisce a una **buona risoluzione e separazione dei picchi** cromatografici

Risoluzione (R)

la **capacità** del sistema cromatografico di **separare due picchi** cromatografici **adiacenti**. È una misura della distanza tra i picchi cromatografici in relazione alla loro larghezza a metà altezza.

Selettività (α)

la **capacità** del sistema di **distinguere e separare i componenti del campione** in base alle loro interazioni chimiche con le due fasi.

Efficienza (N)

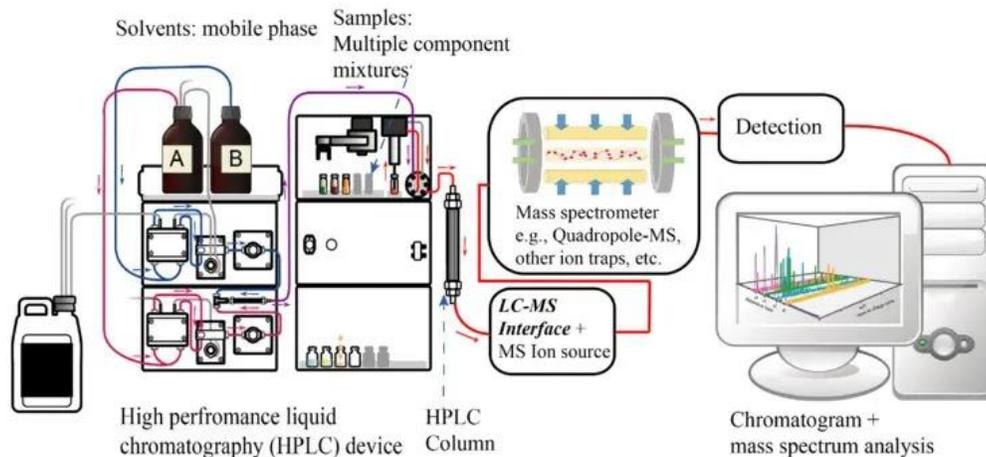
la **capacità** del sistema cromatografico di **eluire** gli analiti come **bande compatte** (strette) o piatti.

HPLC: High Performance Liquid Chromatography

La **HPLC** rappresenta l'evoluzione strumentale della cromatografia in fase liquida su colonna classica. L'HPLC si distingue dalla tradizionale ("bassa") cromatografia liquida perché le pressioni operative sono significativamente superiori (50-350 atmosfere), mentre la **cromatografia liquida ordinaria** si basa tipicamente sulla forza di gravità per far circolare la fase mobile attraverso la colonna.



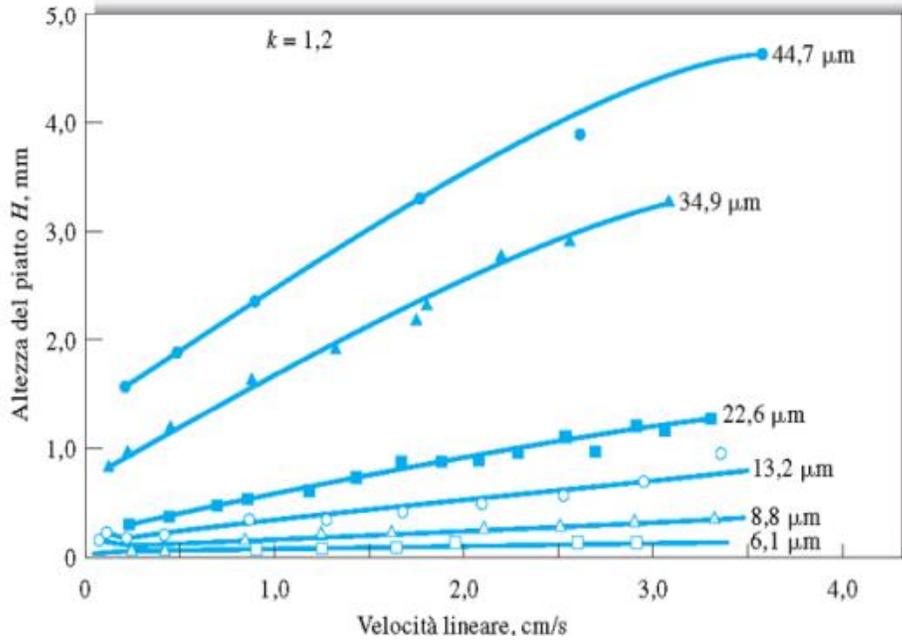
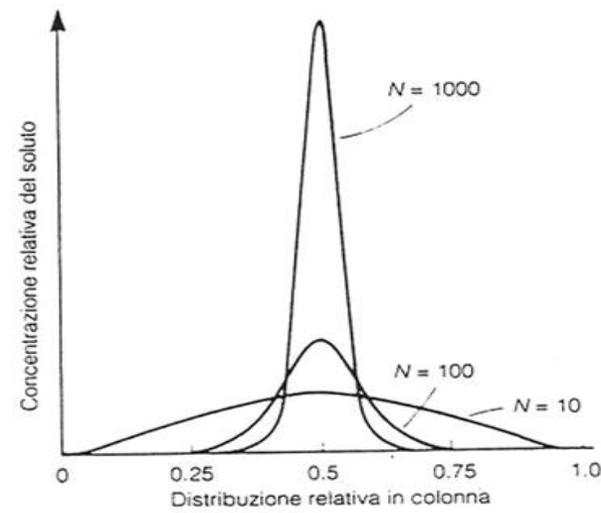
Principio di funzionamento



Si sfrutta la diversa affinità tra una serie di analiti diversi presenti nella stessa miscela per una fase stazionaria e la loro mobilizzazione attraverso una opportuna fase mobile controllata da un gradiente fisso o variabile di pressione.

L'efficienza di un sistema cromatografico si quantifica con il cosiddetto numero di piatti teorici N .

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

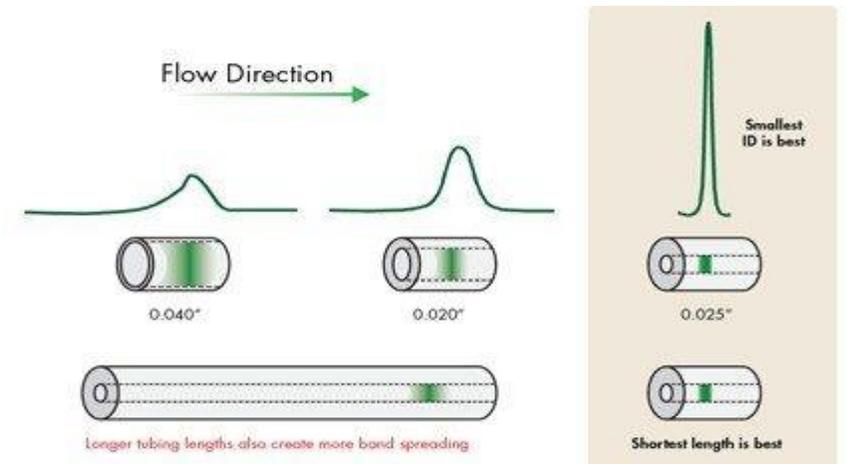


Nell'HPLC riducendo il diametro delle particelle dell'impacchettamento, si ha un incremento del numero di piatti teorici, e quindi dell'efficienza della colonna.

Altri fattori che influenzano l'efficienza della colonna sono le **VARIAZIONI EXTRA-COLONNA**, variazioni causate dallo strumento.

È importante ridurre al minimo:

- Le dimensioni del diametro dei tubi
- Il percorso tra l'iniettore e la colonna

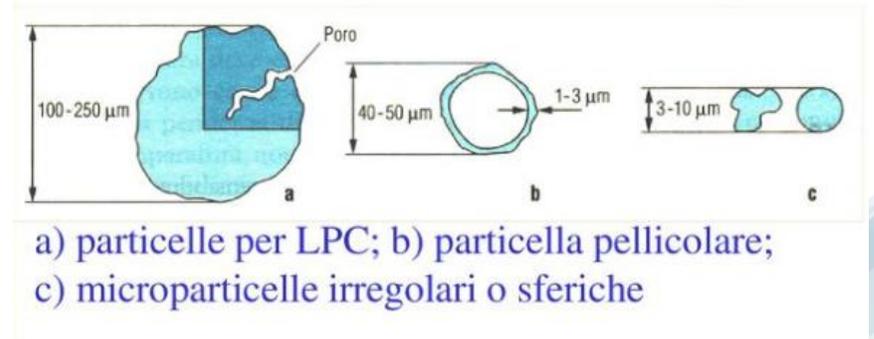


Fase stazionaria

Liquido supportato o chimicamente legato su solido all'interno di una colonna di acciaio o vetro speciale nella quale va a legarsi il soluto.

Si usano due tipi di impaccamento:

- A particelle pellicolari
- A particelle porose



Le fasi stazionarie in HPLC sono costituite da particelle di silice (più raramente allumina), che presenta le seguenti proprietà:

- è in grado di sopportare pressioni molto elevate (> 1000 atm);
- è chimicamente stabile verso tutti solventi a pH non superiore a 8;
- è facile ottenerla sottoforma di particelle uniformi;
- è disponibile in varie dimensioni e porosità (60-100 Å).

Tabella 15.1

Confronto tra le principali caratteristiche dei materiali di riempimento per HPLC

Tipo di riempimento	Granulometria (μm)	ERIELEZZA	Capacità	Caduta di pressione
Macroparticelle porose irregolari	40-60	bassa	alta	bassa
Particelle pellicolari regolari	40	media	bassa	bassa
	10	alta	bassa	media
Microparticelle porose irregolari	5-13	alta	alta	alta
Microparticelle porose regolari	5-10	alta	da modesta a alta	media

Fase mobile

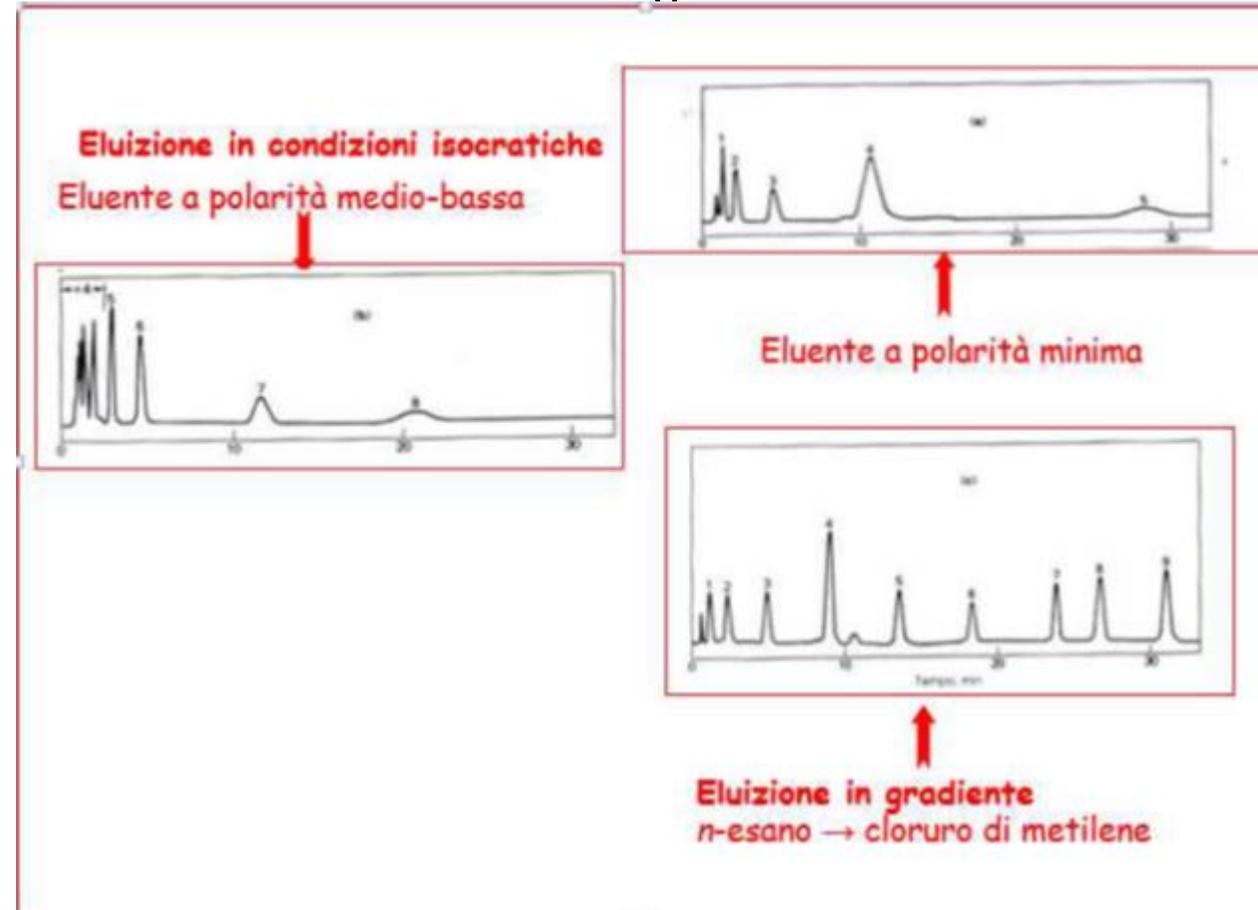
Solventi puri o una miscela di più solventi.
Le proprietà fondamentali sono:

- Elevata purezza
- Non corrosivi
- Bassa viscosità
- Trasparenza UV

1. IN FASE INVERSA (RPLC)	FASE MOBILE: polare (H_2O , CH_3OH , CH_3CN) FASE STAZIONARIA: non polare (Si-O-SiR_3) SOLUTI: non polari
2. IN FASE DIRETTA (NPLC)	FASE MOBILE: non polare (nC_6H_{14} , Et_2O , CHCl_3) FASE STAZIONARIA: polare (Si-OH) SOLUTI: polari

In base al tipo di eluenti utilizzati si avrà:

- Eluizione isocratica
- Eluizione a gradiente

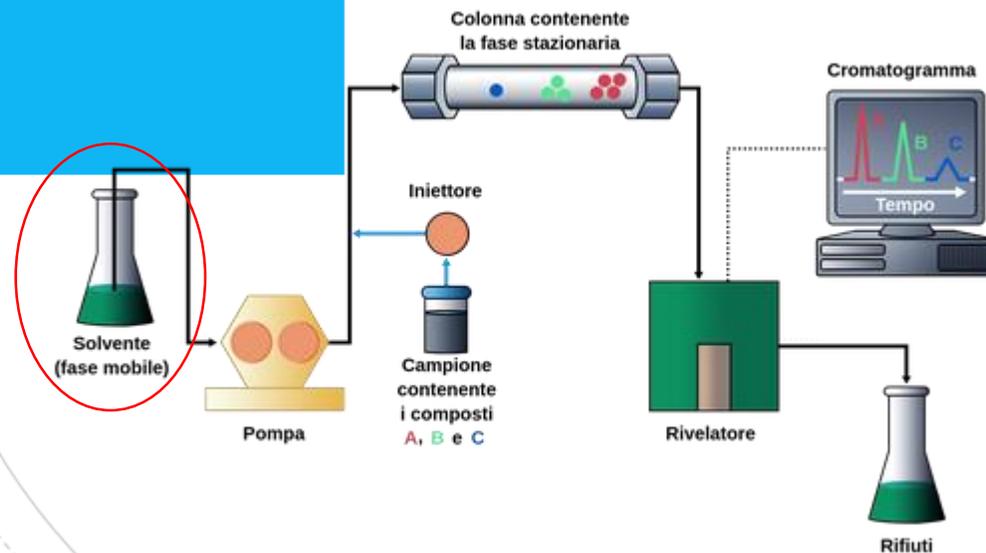


Strumentazione e

A causa delle pressioni elevate, l'attrezzatura per HPLC tende a essere più sofisticata e costosa di quella richiesta per altri tipi.

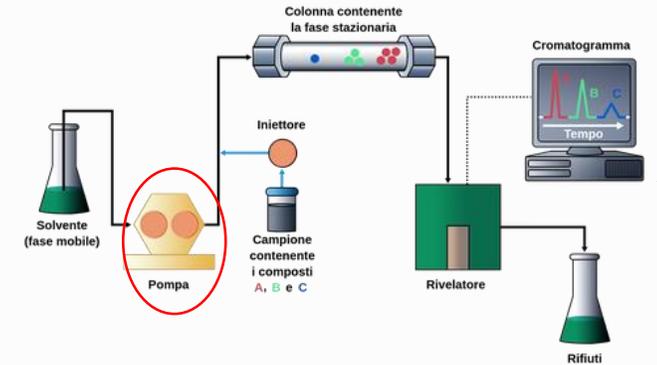
- **Contenitori per eluenti**
- Pompe
- Iniettori
- Colonne
- Rivelatori

sono spesso equipaggiati con un sistema di allontanamento dei gas disciolti e della polvere dai liquidi.

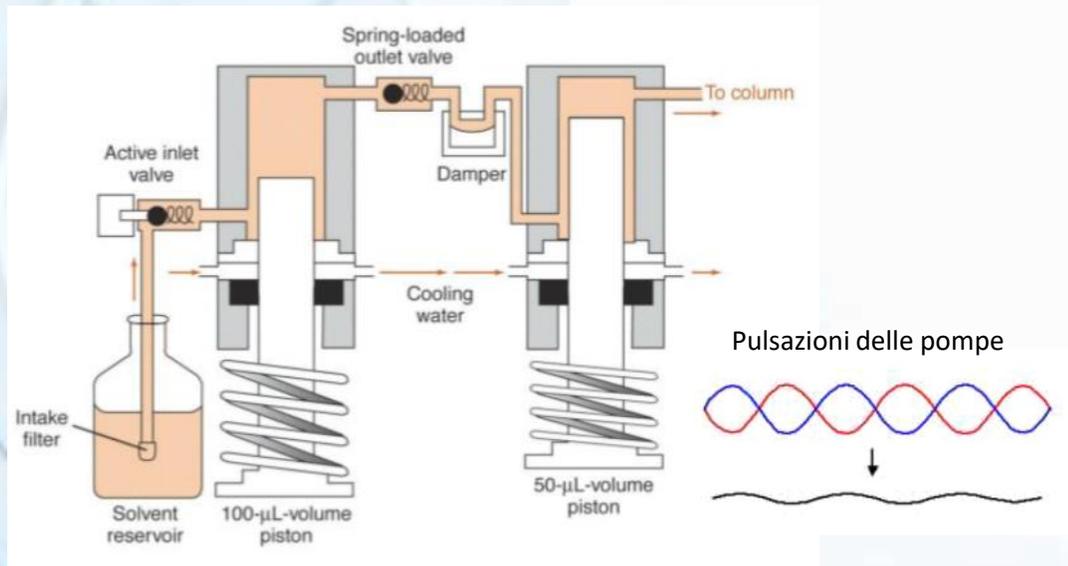


Pompe

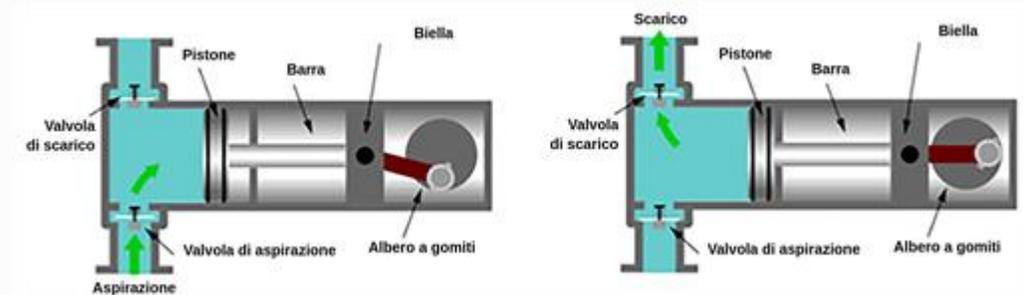
1. Capacità di creare pressioni fino a 6000 Psi, o 414 bar;
2. uscita priva di pulsazioni
3. velocità di flusso che variano da 0,1 a 10 ml al minuto
4. riproducibilità del flusso almeno del 5% relativo
5. resistenza alla corrosione da parte di una varietà di solventi



Pompa reciprocante

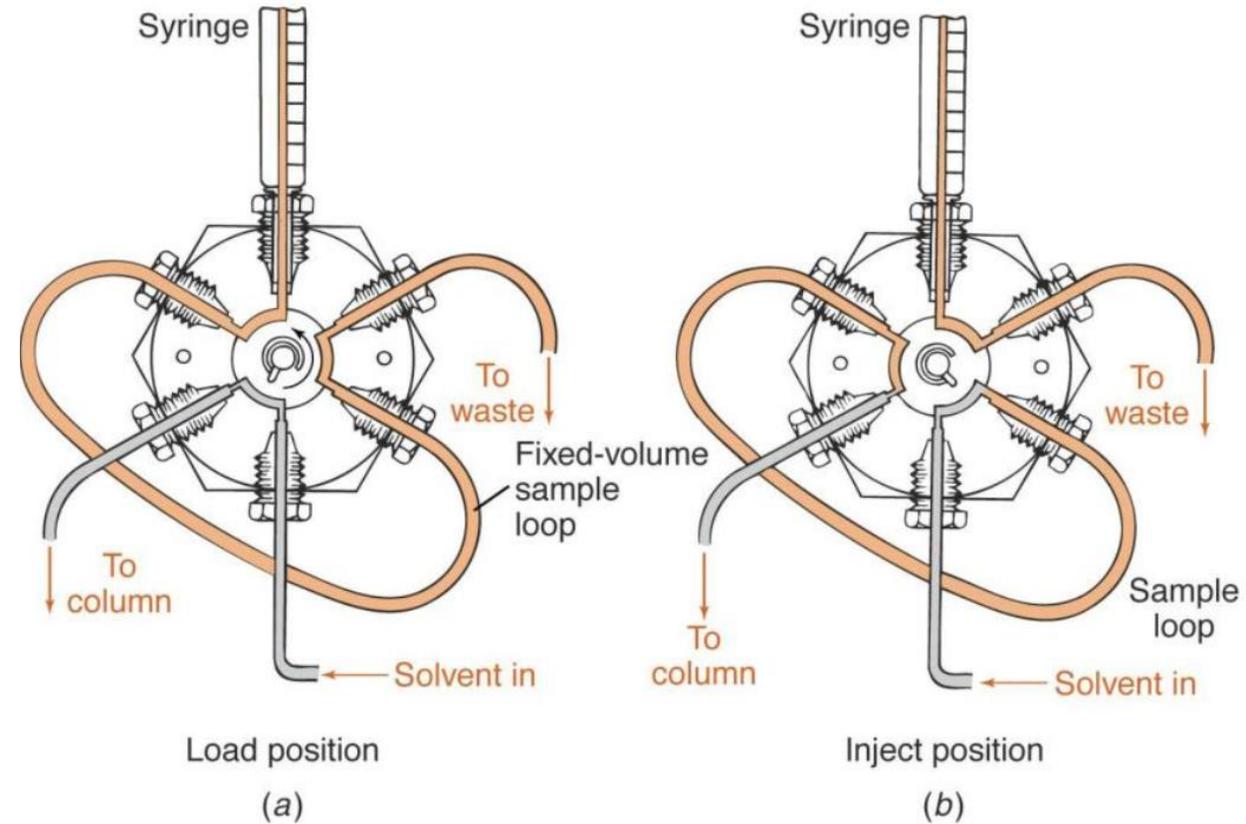
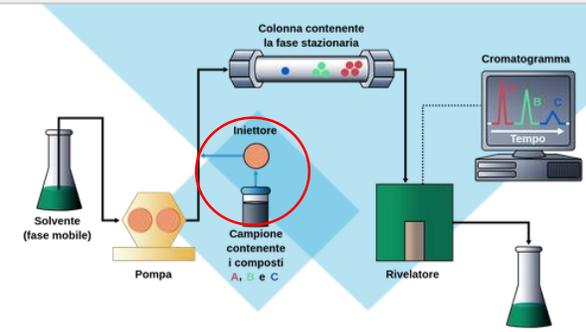


Pompa a siringa



Iniettori

Consentono l'ingresso del campione nello strumento



Funzionamento di un sistema loop

Colonne

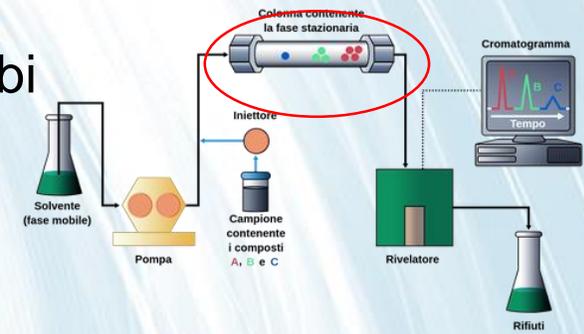
Sono costituite da tubi levigati di acciaio inossidabile, tubi di vetro a parete spessa o tubi di polimeri.

- Diametro tra 3-5 mm
- Lunghezza tra 5-25cm
- Impaccamento tra 3-5 μm



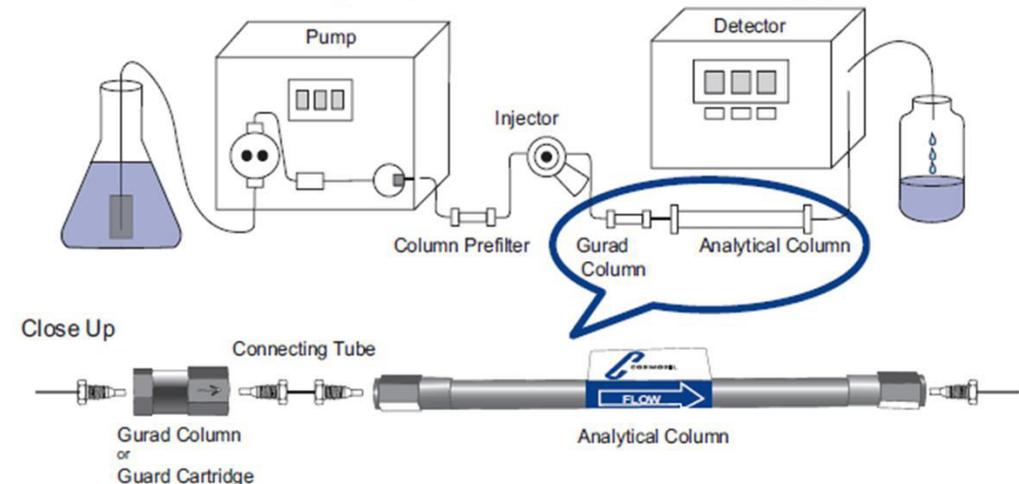
Di solito vengono utilizzate anche una o più colonne di protezione, che vengono poste tra iniettore e la colonna analitica

- Presentano una composizione simile alla colonna analitica
- Hanno una porosità maggiore



Connection to Guard Column

Use COSMOSIL column connecting tube.(Product No. 37843-69) Please refer to page 87 for more information.

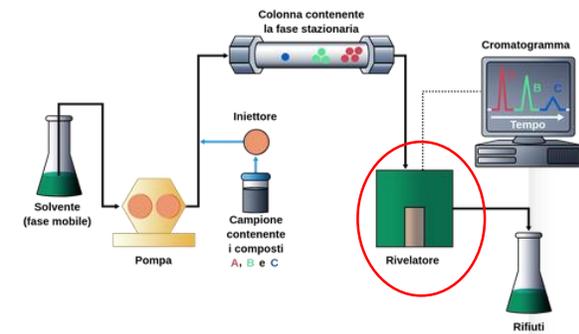


Rilevatori

Esistono due tipi principali di rivelatori per cromatografia liquida:

1. i rivelatori delle proprietà di massa che rispondono ad una proprietà fisica globale della fase mobile
2. I rivelatori delle proprietà del soluto rispondono ad alcune proprietà dei soluti

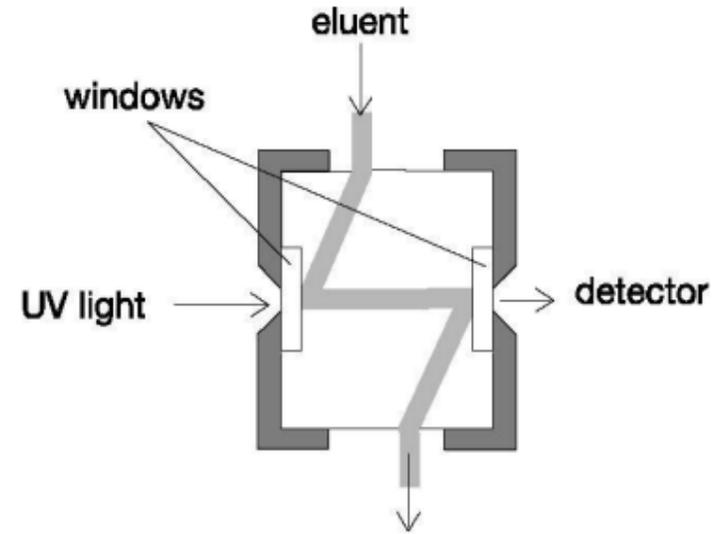
- Sensibilità adeguata
- Buona stabilità e riproducibilità
- Tempo di risposta breve
- Risposta verso tutti gli analiti, oppure, risposta selettiva verso una o più classi di soluti



Rivelatore	LOD (ng)	Selettività	Utilizzabile in gradiente?
Assorbimento UV	0.1-1	selettivo	SI
Indice di rifrazione	100-1000	generale	NO
Fluorescenza	0.001-0.01	selettivo	SI
Elettrochimico	0.01-1	selettivo	NO
Conduttimetrico	0.5-1	selettivo	NO
Assorbimento IR	1000	selettivo	SI
Spettrometro di massa	0.1-1	generale	SI

RIVELATORE AD ASSORBANZA

- Possono essere a lunghezza d'onda fissa o variabile.
- I volumi di cella vanno da 1 a 10 μL
- La lunghezza della cella è compresa tra 2 e 10 mm.

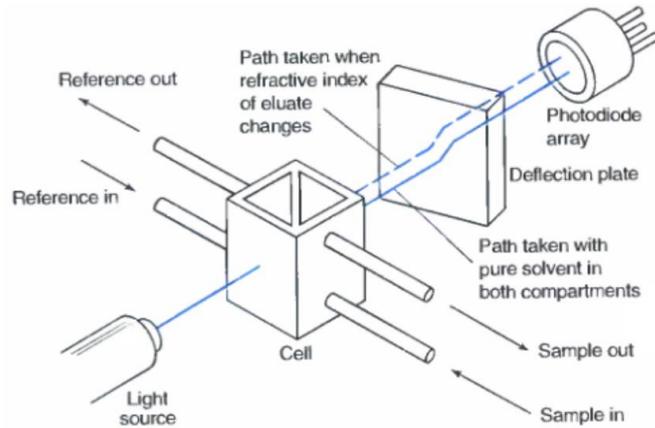
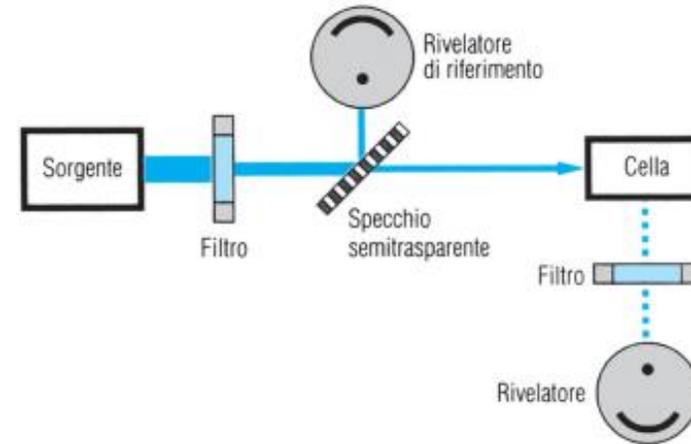


RIVELATORE A SERIE DI DIODI

- Lampada a deuterio per la regione UV (190-380nm) e lampada al tungsteno-alogeno per la regione del visibile (380-800 nm)
- Capacità rapida di scansione delle λ per permettere la registrazione di uno spettro completo
- Elevata sensibilità

RIVELATORI A FLUORESCENZA

- Sensibilità 1000 volte superiore rispetto all'assorbimento UV-visibile
- Limitato alla rivelazione di composti fluorescenti
- È un sistema non distruttivo



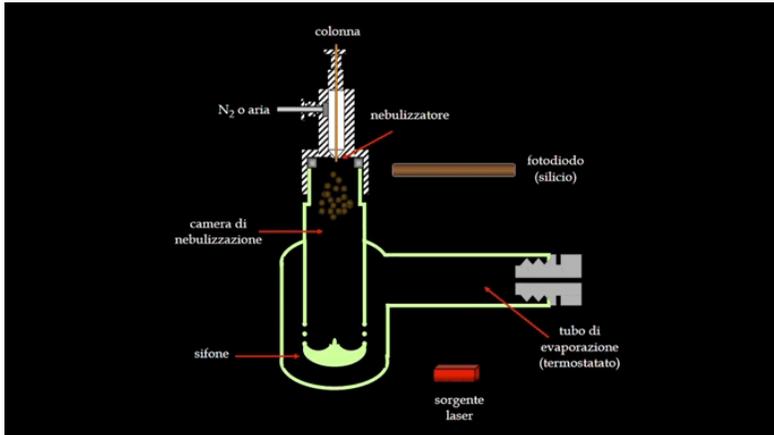
RIVELATORI A INDICE DI RIFRAZIONE

• Meno selettivo di altri detector

- Non adatto con eluizione in gradiente
- Completamente aspecifico
- È un sistema non distruttivo

RIVELATORE A LUCE DIFFUSA IN EVAPORAZIONE

- L'eluato è trasformato in aerosol e mandato in una cella nella quale si misura lo scattering della luce
- Necessita di fasi mobili volatili
- È un sistema distruttivo



RIVELATORE A SPETTROMETRIA DI MASSA

Per lo spettrometro di massa è necessario un campione in fase di gas, quindi il solvente deve essere necessariamente vaporizzato.



RIVELATORI ELETTROCHIMICI

Possibilità di misura in:

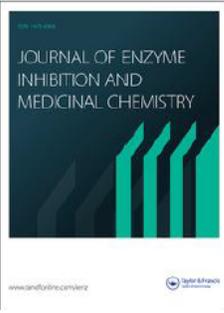
- voltammeteria (per applicazioni particolari)
- amperometria
- coulometria (raro)
- conducimetria (utilizzato in cromatografia ionica)

Vantaggi

1. Le analisi sono rapide e precise
2. Alta capacità di separare anche miscele molto complesse
3. Grande capacità quantitativa e riproducibilità
4. Alta sensibilità
5. Basso consumo di campione
6. È uno strumento versatile che trova applicazioni in diversi ambiti di ricerca

Svantaggi

1. Non è un rivelatore universale
2. Bassa capacità delle colonne
3. Costi elevati



Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry



ISSN: 1475-6366 (Print) 1475-6374 (Online) Journal homepage: www.tandfonline.com/journals/ienz20

Microwave-assisted extraction, HPLC analysis, and inhibitory effects on carbonic anhydrase I, II, VA, and VII isoforms of 14 blueberry Italian cultivars

Adriano Mollica, Marcello Locatelli, Giorgia Macedonio, Simone Carradori, Anatoly P. Sobolev, Roberto F. De Salvador, Simona M. Monti, Martina Buonanno, Gokhan Zengin, Andrea Angeli & Claudiu T. Supuran

Si è andato ad analizzare il contenuto dei componenti biologicamente attivi, in particolare di antociani (*Delphinidin-3-O-galactoside* e *cyanidin-3-O-rutinoside*) e acido clorogenico in estratti di mirtilli provenienti da 14 varietà italiane e i loro effetti inibitori verso 4 isoforme di anidrase carboniche umane, in particolare (hCA) (hCA I, II, VA e VII).

Metodo: HPLC-PDA

Modalità: eluizione a gradiente 95%:5% di acqua e acetonitrile

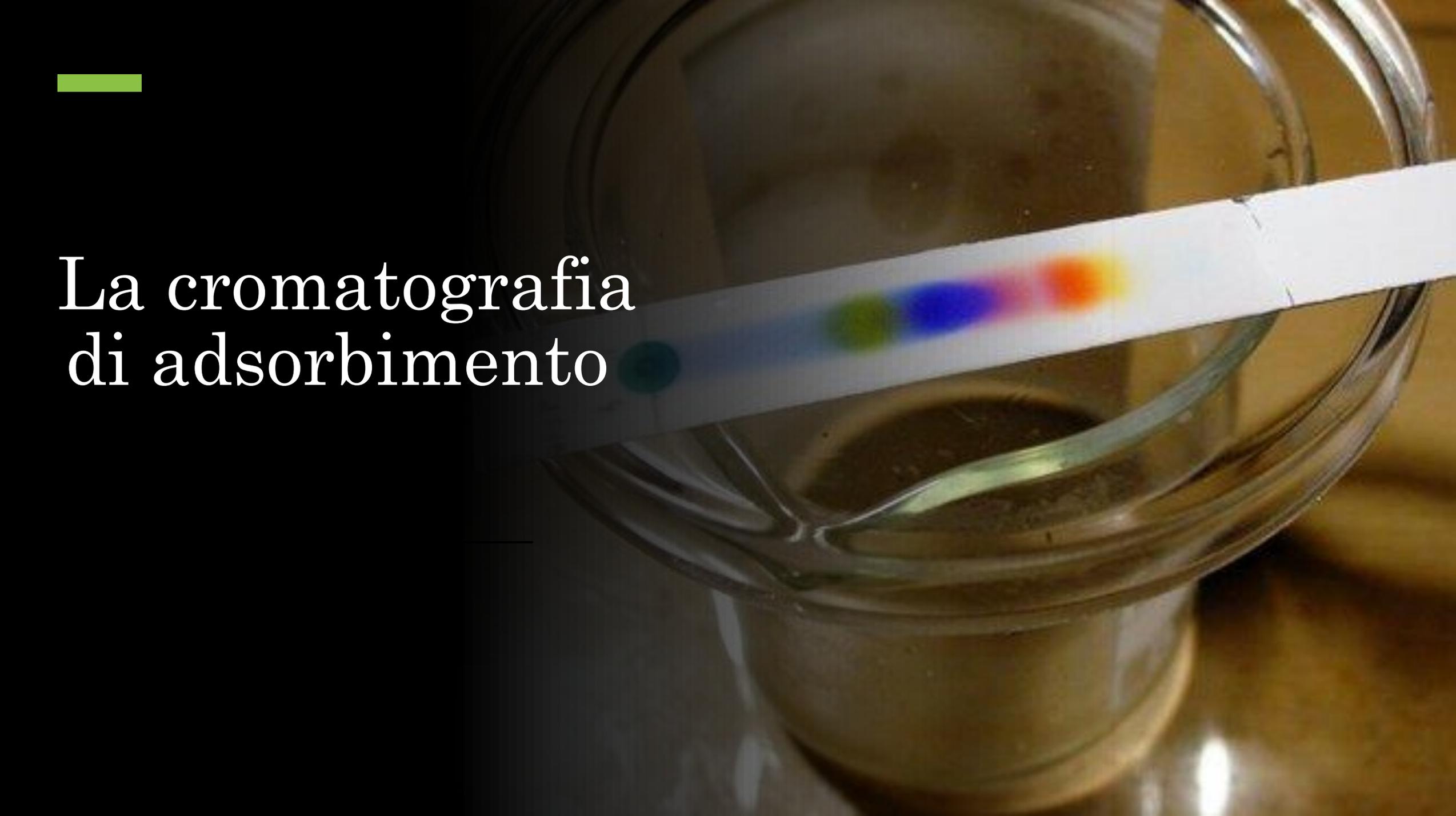
Intervallo di linearità: 1-

100µg/mL

Calibrazione: calibrazione con matrice esterna



Nel complesso, i dati raccolti mostrano che gli antiossidanti naturali trovati nei mirtilli potrebbero essere utili per sviluppare agenti farmacologici in cui sono coinvolte varie CA, ad esempio, agenti antiobesità, antitumorali o anticonvulsivanti.

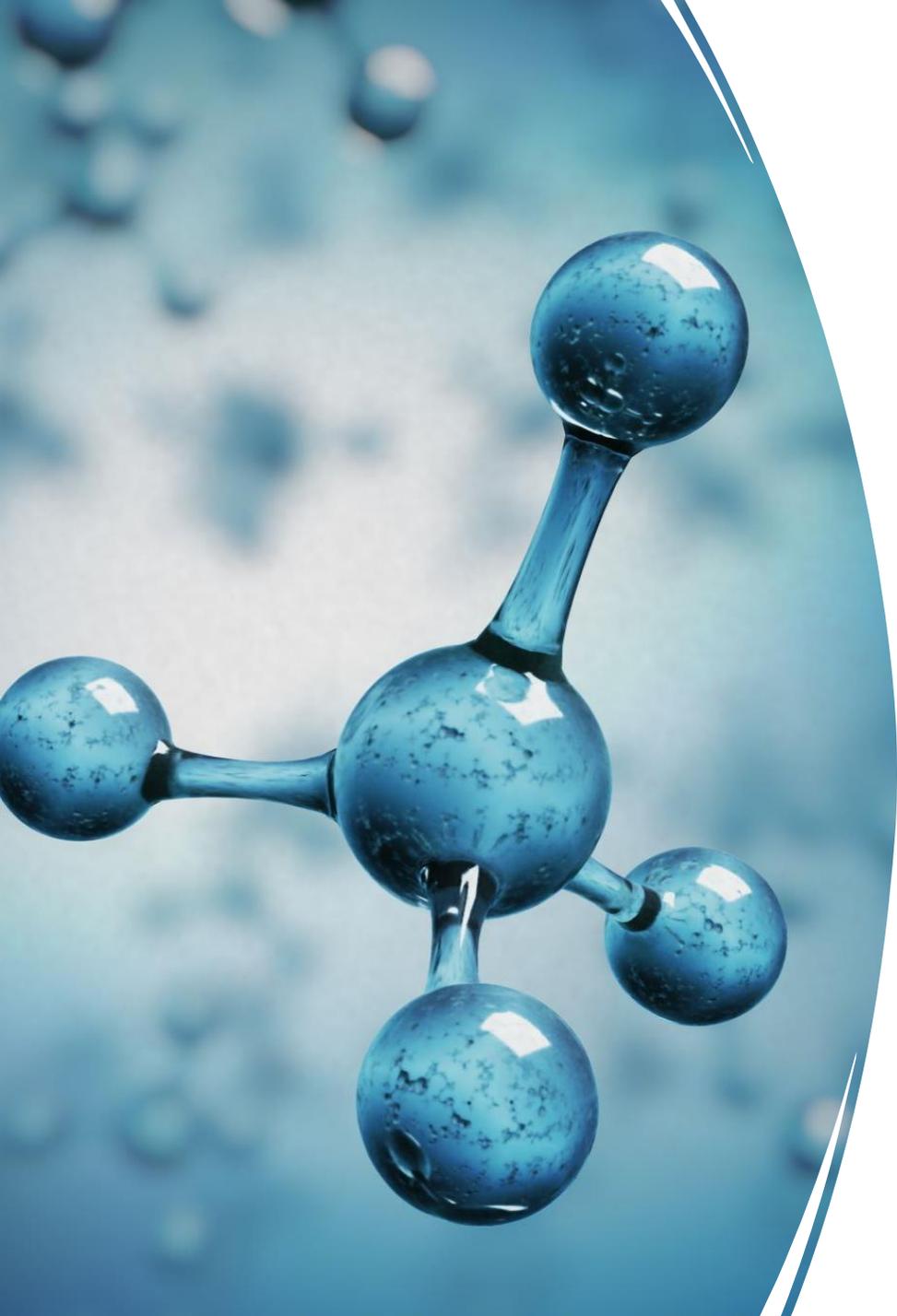
A thin-layer chromatography (TLC) plate is shown, partially submerged in a glass beaker containing a dark brown liquid. The plate is held at an angle, and a solvent front is visible as a horizontal line. Several colored spots are present: a dark blue spot near the origin, a green spot, a blue spot, a purple spot, a red spot, and a yellow spot. A small green horizontal bar is located in the top left corner of the image.

La cromatografia di adsorbimento

Principi generali

- La cromatografia di adsorbimento è detta anche cromatografia liquido- solido in quanto al processo separativo prendono parte una fase stazionaria costituita da un solido e una fase mobile costituita da un liquido
- Viene generalmente effettuata in due modalità distinte: su colonna e su strato sottile





Forze e interazioni tra adsorbente e componenti della miscela

- Le interazioni in gioco tra adsorbente e componenti di una miscela da separare nella fase mobile sono molteplici e determinate da legami di tipo van der Waals, dipolo-dipolo, ad idrogeno etc.
- La forza con cui una sostanza è adsorbita sulla superficie della fase solida dipende principalmente dalla natura dei suoi gruppi funzionali
- Idrocarburi saturi < alchini, alcheni, idrocarburi aromatici
- La forza di adsorbimento oltre che dalla polarità dipende dalle caratteristiche stereochimiche e dalla geometria della molecola che interagisce con l'adsorbente

Le fasi stazionarie

Non devono interagire con il soluto

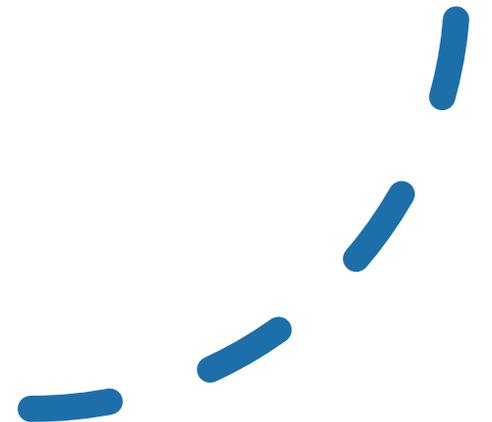
Non devono solubilizzarsi nell'eluente

Devono permettere un facile percolamento dell'eluente

Gel di silice e alluminia sono gli adsorbenti che si avvicinano di più alle caratteristiche ideali

Inoltre
l'adsorbimento
è un fenomeno
superficiale,
dunque:

- La fase stazionaria deve avere un'elevata estensione superficiale che favorisca il rapido instaurarsi dell'equilibrio tra la fase stazionaria e quella mobile
- Particelle con granulometria uniforme al fine di rendere più efficaci i fenomeni di adsorbimento



Fasi mobili

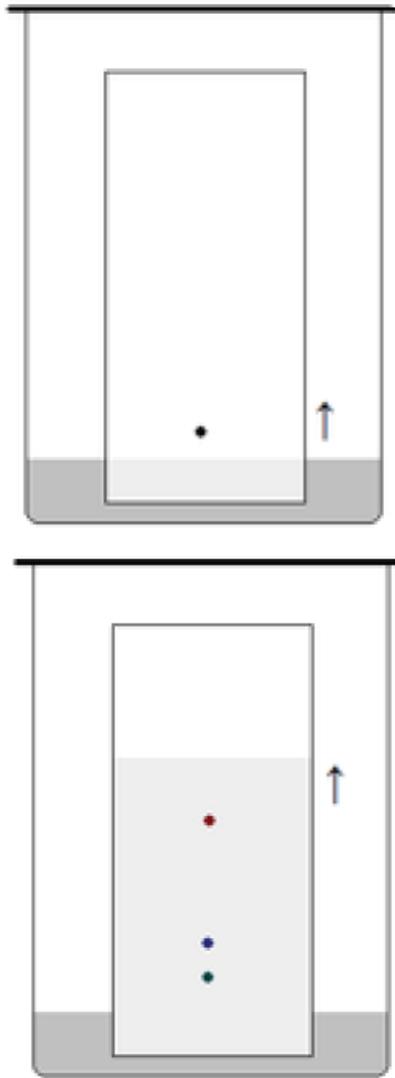
Non deve interagire né con l'adsorbente né con i prodotti da separare

Deve far migrare i componenti della miscela da separare

Deve avere un basso punto di ebollizione così da permettere un facile recupero dei soluti per evaporazione

Non deve essere tossico

Cromatografia su strato sottile (TLC)

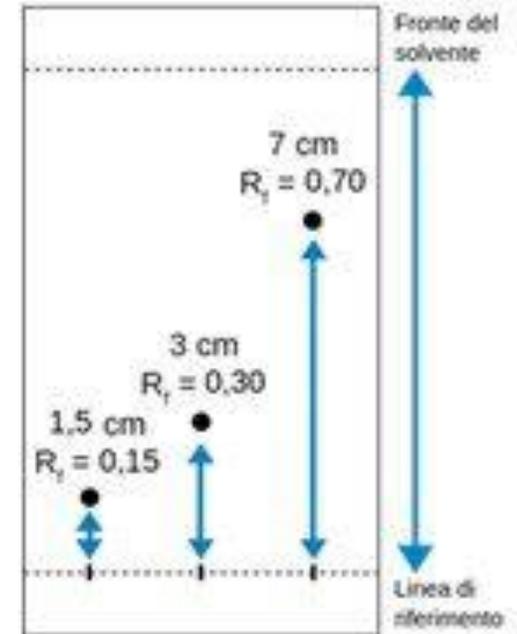


- In questo tipo di cromatografia la fase stazionaria è costituita da un sottile strato di adsorbente
- Il materiale adsorbente viene fatto aderire su una lastra di vetro o plastica
- La lastra viene immersa nell'eluente che salirà per capillarità
- La TLC viene utilizzata per analizzare farmaci e sostanze farmaceutiche.
- La TLC può essere impiegata per identificare e quantificare tossine e sostanze tossiche presenti in campioni biologici, come il sangue o l'urina, utilizzati per il monitoraggio di avvelenamenti o l'esposizione a sostanze nocive.

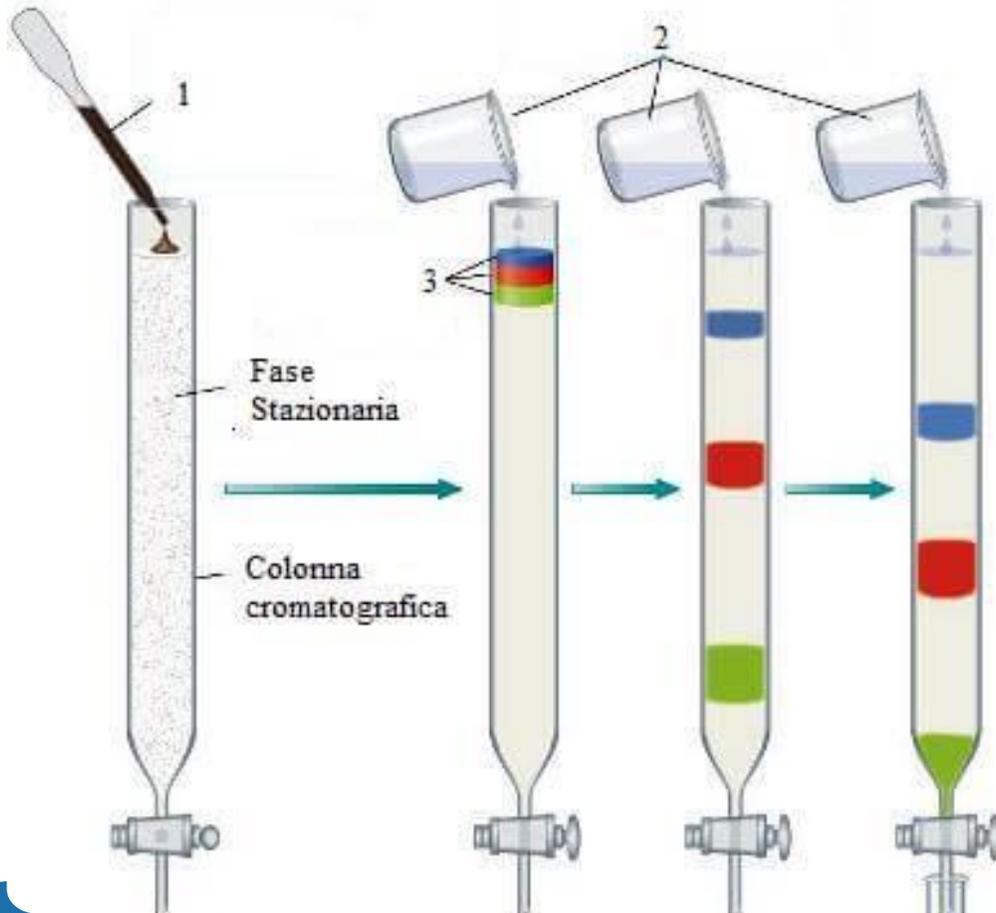
Fattore di ritenzione

- È dato dal rapporto tra la distanza percorsa dalla sostanza A e quella percorsa dal solvente
- Fornisce informazioni sul grado di interazione di un componente con la fase stazionaria rispetto alla fase mobile
- Il valore è compreso tra 0 e 1

$$R_f = \frac{\text{Distanza percorsa dalla sostanza}}{\text{Distanza percorsa dal fronte del solvente}}$$



Cromatografia su colonna



- Si utilizzano in genere colonne di vetro, plastica o metallo e le dimensioni variano in funzione della quantità di sostanza da separare
- La fase stazionaria è immobilizzata dentro la colonna
- La fase mobile consiste in un solvente organico o miscela di solventi
- La cromatografia su colonna può essere utilizzata per separare e analizzare gli inquinanti organici presenti nelle acque, come pesticidi, idrocarburi policiclici aromatici (IPA)
- può essere impiegata per separare e analizzare i contaminanti organici presenti nel suolo
- può essere impiegata per analizzare campioni di aria e identificare la presenza di inquinanti atmosferici

Articolo scientifico:

- Valutazione della TLC fluorescente per la diagnosi di ulcera di Buruli
- È una malattia infettiva tropicale causata da [Mycobacterium ulcerans](#)
- È presente in ambienti tropicali e subtropicali dell'Africa occidentale ma si è verificata anche in altre parti del mondo, come Australia e alcune zone dell'America latina e dell'Asia



Introduzione:

- Generalmente come strumento diagnostico si utilizza la PCR ma questa presenta dei limiti: richiede la presenza di laboratori ben attrezzati, richiede strumentazione e strutture sofisticate e personale altamente qualificato.
- OMS dà priorità ad un test che sia rapido e poco costoso
- Il metodo f-TLC è stato valutato per la diagnosi dell'ulcera di Buruli

RESEARCH ARTICLE

Evaluation of the fluorescent-thin layer chromatography (f-TLC) for the diagnosis of Buruli ulcer disease in Ghana

Richard K. Amewu^{1*}, Gideon Atinga Akolgo¹, Millicent Esi Asare¹, Zigli Abdulai¹, Anthony S. Ablordey², Kingsley Asiedu³

¹ Department of Chemistry, University of Ghana, Accra, Ghana, ² Department of Bacteriology, Noguchi Memorial Institute for Medical Research, University of Ghana, Accra, Ghana, ³ Department of Control of Neglected Tropical Diseases, World Health Organization, Geneva, Switzerland

* ramewu@ug.edu.gh

- **CONCLUSIONI:** il metodo ha tempi brevi ed è economico, è utile per la diagnosi e aiuterà a prendere decisioni cliniche precoci. Tuttavia richiede leggere modifiche per quanto riguarda la lettura automatica in modo da poter diventare un eccellente strumento diagnostico

• <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35917367/>

- **PAZIENTI:** Lo studio in questione ha analizzato 449 pazienti sospetti di BU
- **ANALISI DATI:** i parametri diagnostici del test sono stati utilizzati per determinare l'accuratezza di f-TLC rispetto al metodo PCR
- **RISULTATI:** la sensibilità di f-TLC è stata del 66,4% ; la specificità è stata del 88,5% mentre l'accuratezza diagnostica è stata del 88,2%

Cromatografia di ripartizione

Fase mobile: un liquido

Fase stazionaria: un liquido (su supporto solido)
(immiscibili)

Permette la separazione di composti ionici e non.

PASSATO

Colonne *liquido-liquido*

(liquido mantenuto in loco per adsorbimento fisico)

PRESENTE

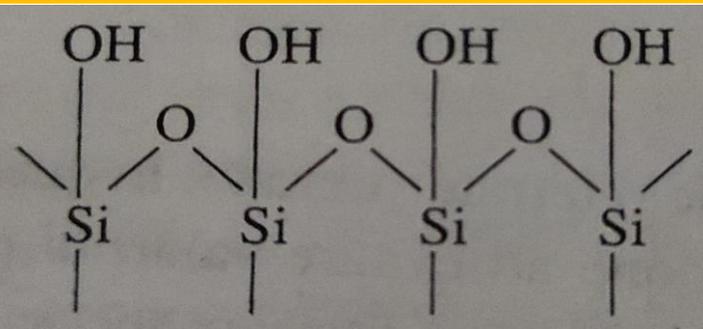
Colonne a fase *liquida legata*

(liquido mantenuto in loco grazie a un legame chimico)

Supporto:

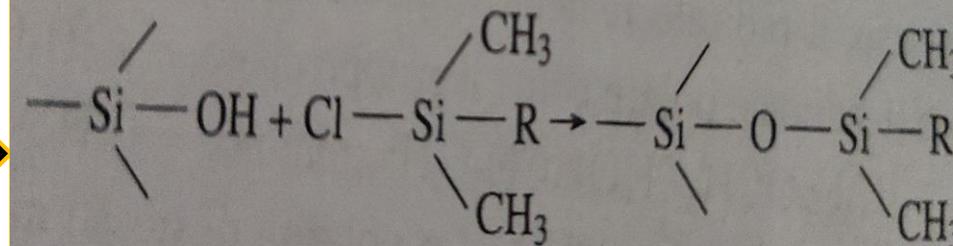
- Impasti di silice rigida
- Impasti a base di silice

Si presentano sottoforma di insiemi di particelle uniformi, porose, meccanicamente resistenti, con diametro tra 1,5 e 10 μm



Superficie della silice completamente idrolizzata, costituita da gruppi silanolo chimicamente reattivi

Dalla reazione tra superficie idrolizzata e un clorosilano organico si ottengono silossani particolarmente utili come rivestimenti a fase legata



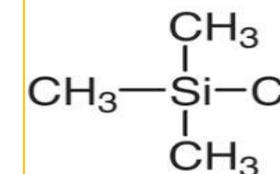
La catena R di solito è una catena C8 (n-ottile) o C18 (n-ottil-decile). Catene più lunghe = impaccamenti più ritentivi e puoi usare campioni più grandi)

Un rivestimento legato può, di solito, essere trattato come un liquido convenzionale trattenuto fisicamente!

Tuttavia:

- la copertura della superficie è limitata per effetti sterici
- I gruppi SiOH (silanolo) non reagiti impartiscono alla superficie polarità, che può causare episodi di *tailing*

Per evitarlo:
Incappucciamento con clorotrimetilsilano



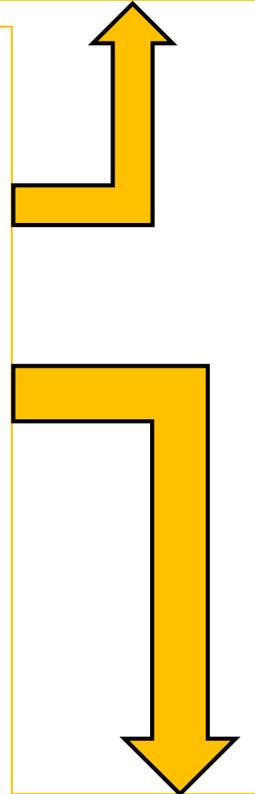
Cromatografia a fase normale

- **Fase stazionaria:** composto fortemente polare (es. Acqua)
- **Fase mobile:** solvente relativamente non polare (es. Esano)
- *Il componente meno polare viene eluito per*

Cromatografia a fase inversa

- **Fase stazionaria:** composto non polare (es. Idrocarburi)
- **Fase mobile:** solvente relativamente polare (es. Acqua)
- *Il componente più polare viene eluito per primo, quindi aumentando la polarità della fase mobile aumenta il tempo di eluizione*

Il trasferimento di massa è più rapido!



Si può usare l'acqua come fase mobile!

Da cosa dipende il successo del metodo?

1) Dalla scelta della fasi

2) Dal riuscito **accordo** tra le polarità di soluto, fase mobile e fase stazionaria

La polarità della fase stazionaria si fa coincidere grossomodo con quella degli analiti e per l'eluizione si usa una fase mobile di polarità notevolmente diversa...

...altrimenti i tempi di ritenzione diventano troppo brevi, perchè nel caso opposto la fase stazionaria non riuscirebbe a competere adeguatamente per i componenti del campione.

Bisogna ovviamente evitare la situazione opposta, in cui troppa somiglianza tra polarità di soluto e fase stazionaria porterebbe a tempi di ritenzione troppo lunghi.

Tenendo conto di questa equazione:

$$N = 16 R_s^2 \left(\frac{\alpha}{\alpha - 1} \right)^2 \left(\frac{1 + k_B}{k_B} \right)^2$$

Per migliorare la risoluzione del metodo si può:

- 1) **Alterare il fattore di ritenzione k** , facendolo cadere tra 2 e 10 (in miscele complesse tra 0,5 e 20),
- 2) **Alterare il fattore di selettività α .**

Cambiare la composizione della fase mobile (per alterare entrambi) o **scegliere un impacchettamento diverso** (per alterare alfa).

Nella **cromatografia di ripartizione** la “forza” del solvente è detta

“**indice di polarità (P')**”.

Snyder definisce questo indice come: “la solubilità di una sostanza in tre solventi:

- diossano (accettore di protoni con basso momento dipolare),
- nitrometano (accettore di protoni con elevato momento dipolare)
- alcol etilico (donatore di protoni con elevato momento dipolare)”



È una misura numerica della polarità relativa dei

solventi



Questo indice, se modificato, cambia anche il fattore di ritenzione **k**
(Di solito, una variazione di P' di due unità comporta una variazione di k di circa dieci volte)

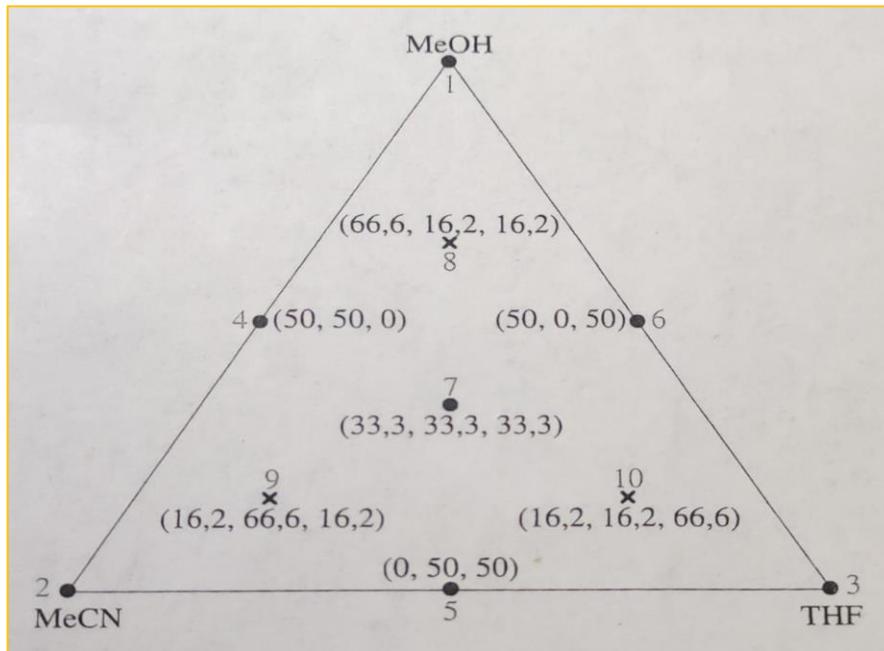


Infatti, di solito nelle separazioni a fase inversa si usa una miscela del solvente contenente acqua ed un solvente organico polare, cambiando la concentrazione di acqua per variare P' e

Se variare k non basta e le bande continuano a sovrapporsi, bisogna rendere più grande il **fattore di selettività α** .

Variando la natura chimica della fase mobile, mantenendo k circa uguale, sfruttando il "**triangolo di selettività del solvente**".

Il "**triangolo di selettività del solvente**" è uno "**strumento**" utilizzato nella cromatografia liquida per **valutare la compatibilità** di un **solvente** con una specifica **fase stazionaria** e una specifica **fase mobile**. Questo concetto aiuta a **selezionare il solvente più adatto** per un'esperimento di cromatografia, tenendo conto delle interazioni chimiche tra i componenti del campione e i solventi impiegati.



Presi **tre modificatori di solvente** (ad es. Metanolo, acetonitrile e tetraidrofurano), usando l'**acqua per** **aggiustare la forza** dei solventi e delle miscele si può **ottenere un opportuno valore di k** .

Tre composizioni binarie di solventi definiscono i **tre vertici** del triangolo.

Con **una decina di esperimenti**, in media, si ottiene la **composizione del solvente** che produrrà la **selettività migliore** per un certo **intervallo di k** .

- Gli impaccamenti legati a fase inversa, usati in congiunzione con solventi fortemente polari (spesso acquosi), si avvicinano al sistema universale ideale per la cromatografia liquida.
- Grazie al loro ampio *intervallo di applicabilità*, alla loro *convenienza* e alla *facilità con cui k ed α possono essere* vengono spesso applicati prima di ogni altro per separazioni esplorative con nuovi tipi di campioni.

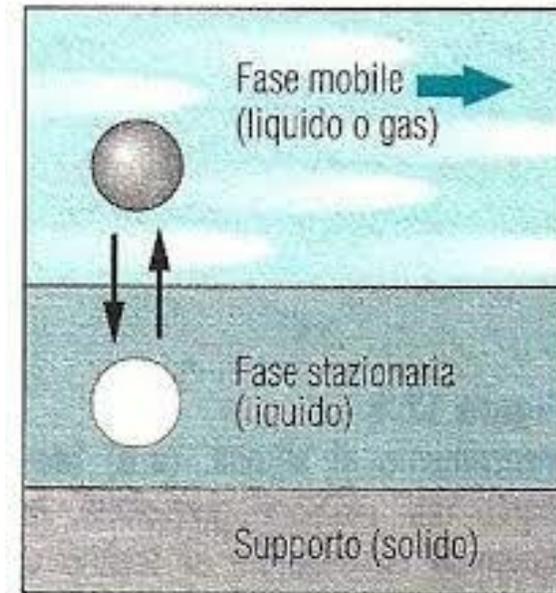
Campo	Miscela tipiche
Prodotti farmaceutici	Antibiotici, sedativi, steroidi, analgesici
Prodotti biochimici	Amminoacidi, proteine, carboidrati, lipidi
Prodotti alimentari	Dolcificanti artificiali, antiossidanti, aflatossine, additivi
Prodotti chimici industriali	Aromatici condensati, tensioattivi, propellenti, tinture
Inquinanti	Pesticidi, erbicidi, fenoli, difenili policlorurati
Scienza forense	Droghe, veleni, alcool ematico, narcotici
Chimica clinica	Acidi biliari, metaboliti dei farmaci, estratti delle urine, estrogeni

"The separation of ketosteroids by partition chromatography using nitromethane as stationary phase"

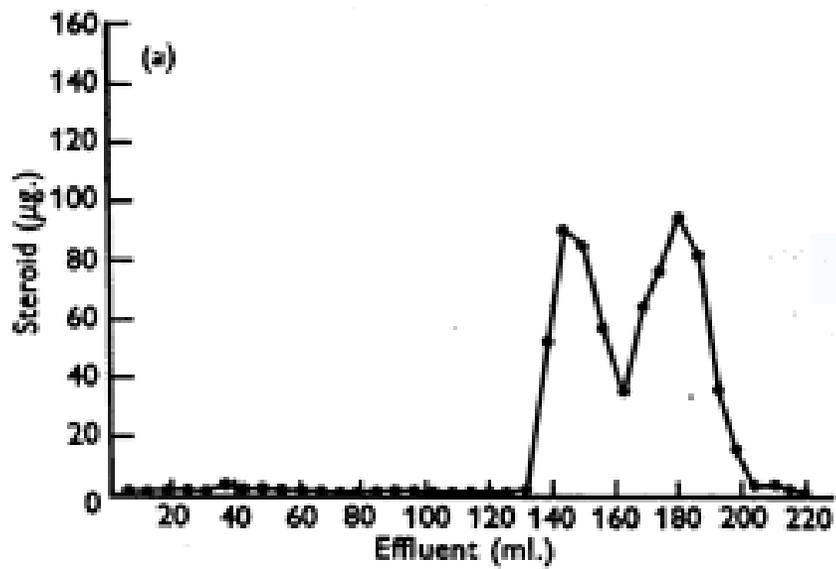
Nel presente studio, la cromatografia di ripartizione è stata utilizzata per separare i chetosteroidi urinari

- **Fase stazionaria:** Colonne di acido silicico contenenti nitrometano.
- **Fase mobile:** una miscela di etere di petrolio e cloroformio, saturata di nitrometano.

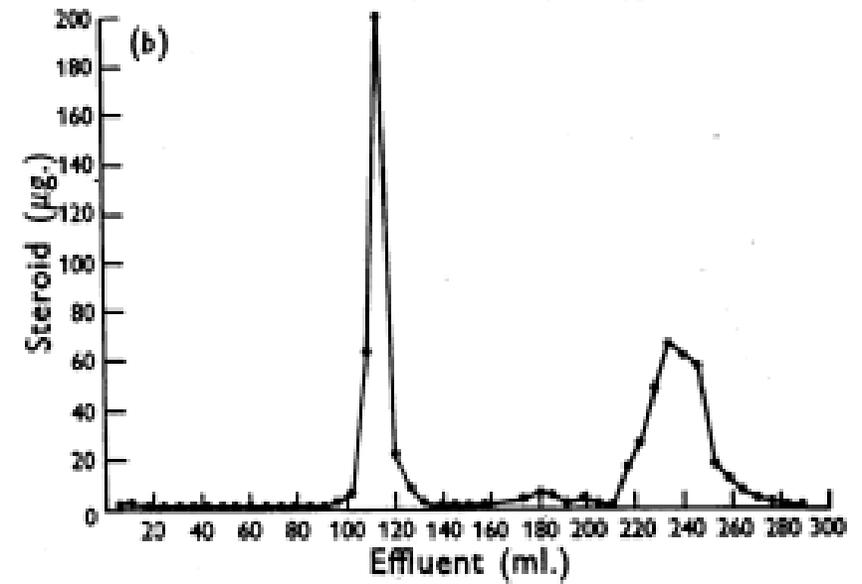
*-fase stazionaria polare
-fase mobile meno polare*



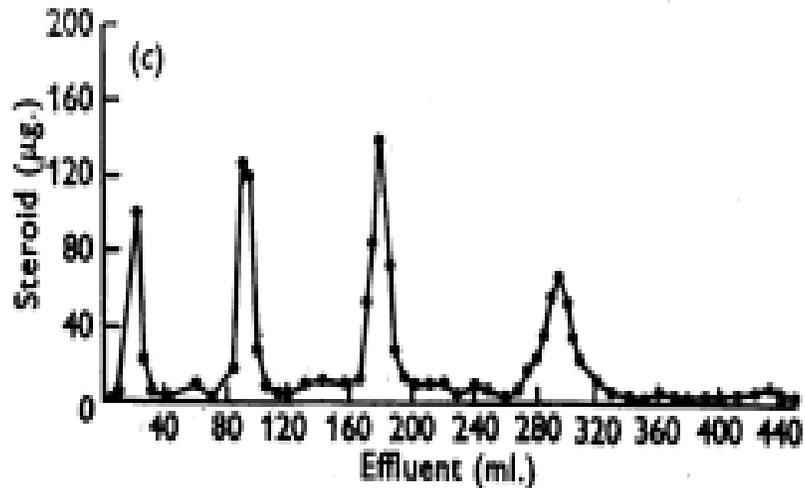
Risultati di separazioni di miscele di steroidi



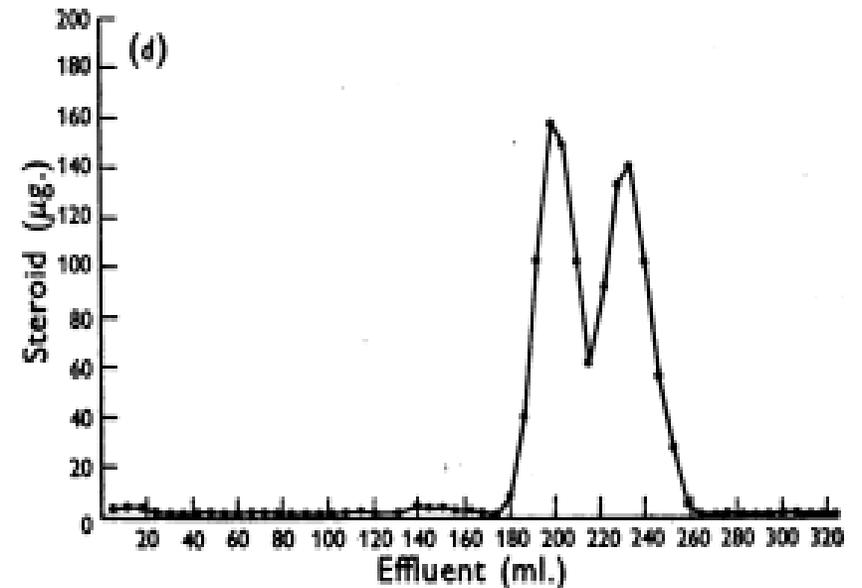
Deidroepiandrosterone e epiandrosterone



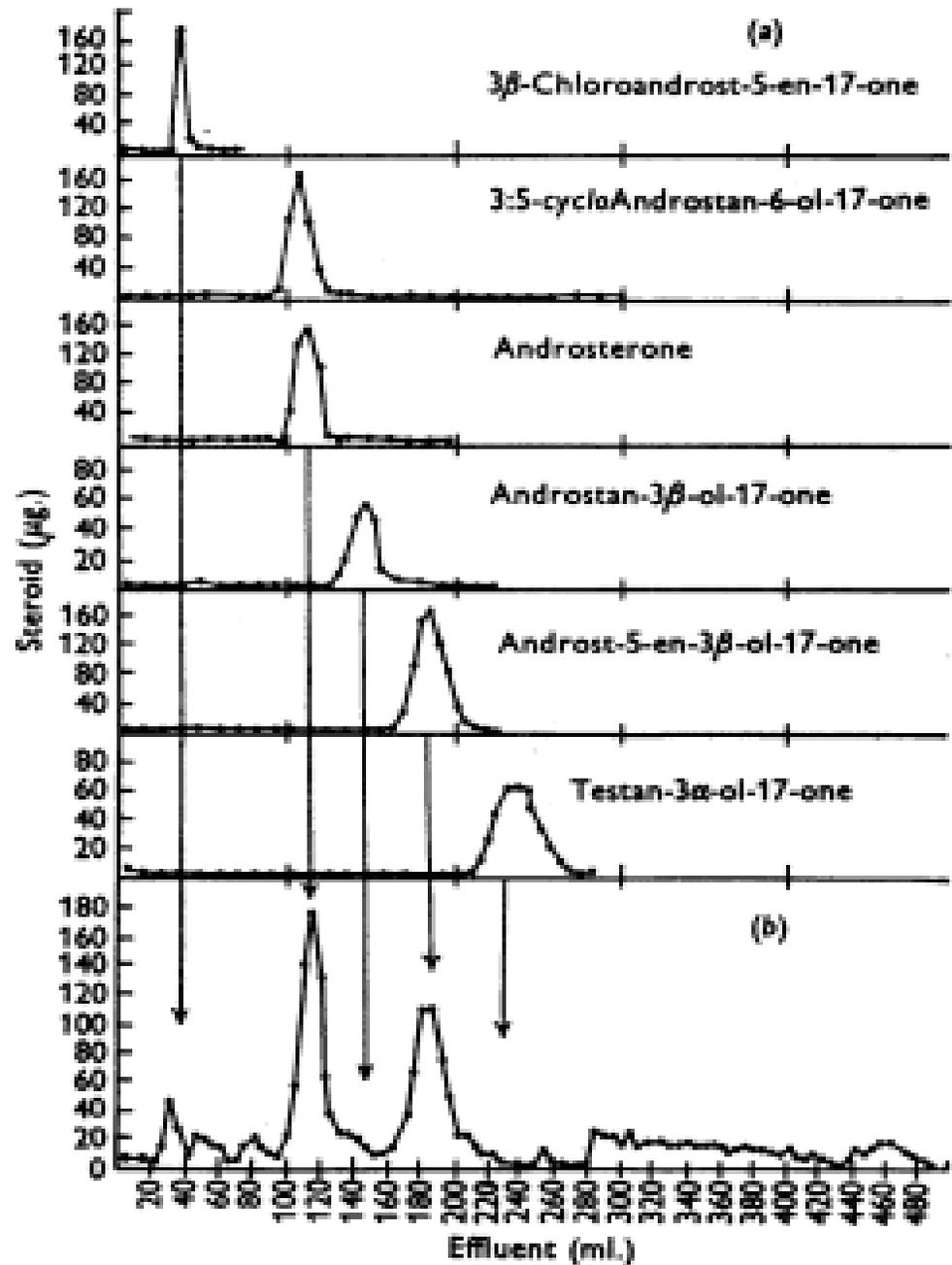
Androsterone e etiocholanolone



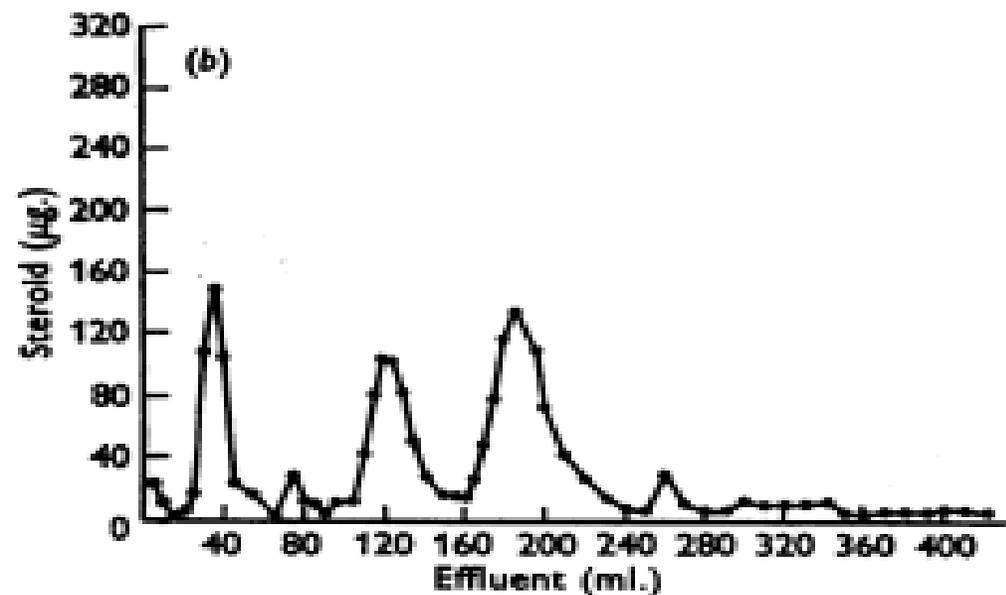
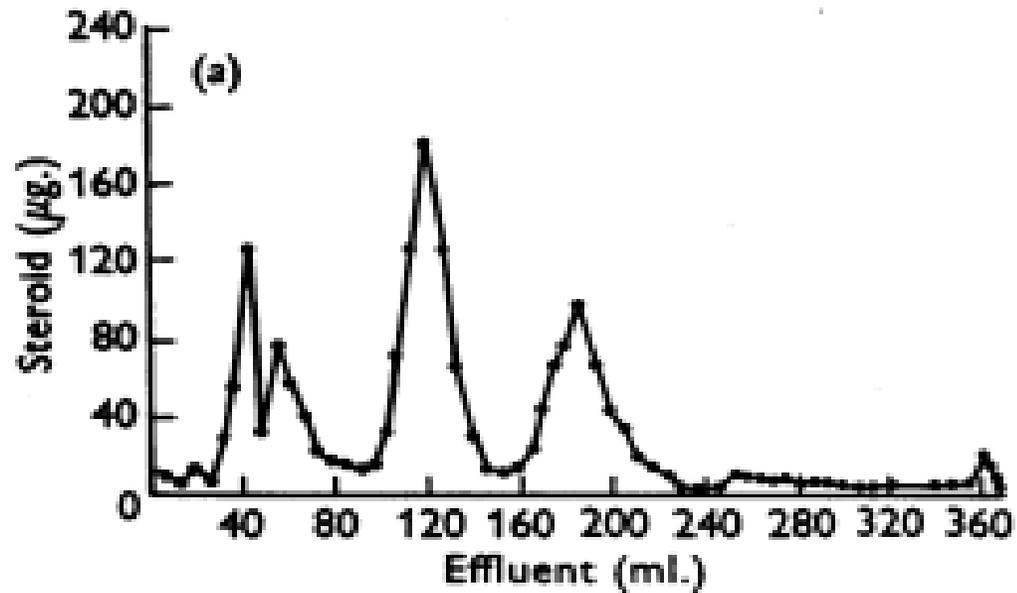
4-Cholesten-3-one, androsterone, androst-5-en-3 β -ol-17-one e androst-4-ene-3:17-dione.



Androst-5-en-3 β -ol-17-one e etiocholanolone



- a) *Comportamento di diversi chetosteroidi in colonne di acido silicico*
- b) *Pattern finale dei diversi chetosteroidi presenti nelle urine di una donna normale (26 anni)*



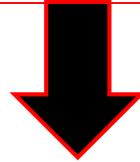
- a) Pattern ottenuto dall'estratto di chetosteroidi urinario di un uomo normale (24 anni).
- b) Pattern ottenuto dall'estratto di chetosteroidi di un uomo psicopatico con tratti schizofrenici e depressivi (38 anni).

Ci sono ancora studi in corso sulle correlazioni esatte tra livelli di chetosteroidi nelle urine e disturbi psichiatrici come depressione e schizofrenia, tuttavia:



- a) alcuni metaboliti dei chetosteroidi, come il cortisolo, possono essere associati (sulla base della quantità) alla depressione.
- b) ci sono alcune evidenze che suggeriscono una correlazione tra livelli di chetosteroidi e disturbo schizofrenico.

In conclusione, lo studio ha dimostrato che la cromatografia di ripartizione (con queste scelte di fase stazionaria e mobile) è efficace nella separazione dei chetosteroidi.



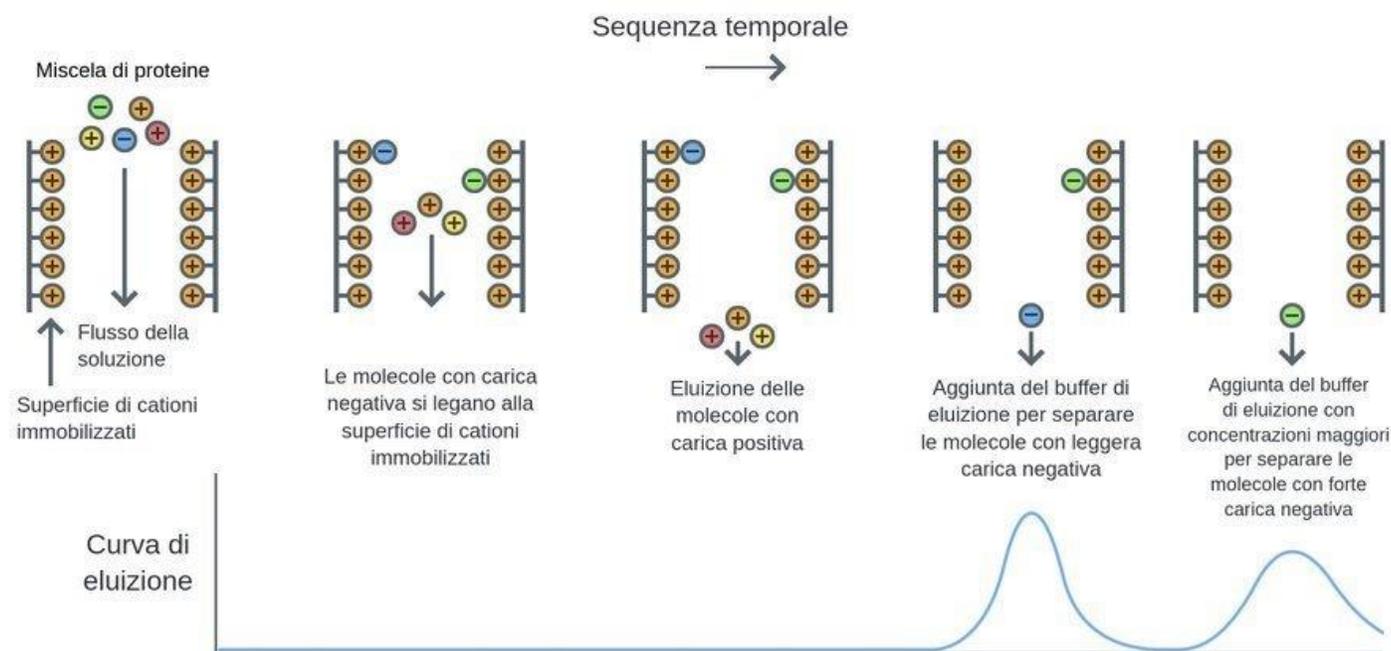
Le cromatografie sui chetosteroidi sono utili a vari scopi:

- **Diagnosi e monitoraggio di disturbi endocrini:** Le **anomalie nei livelli di chetosteroidi** possono indicare **condizioni mediche** come sindrome

BIBLIOGRAFIA

- BUTT WR, MORRIS P, MORRIS CJOR, WILLIAMS DC. The polarographic estimation of steroid hormones. 5. Determination of progesterone in blood. *Biochem J.* 1951 Sep;49(4):434–438. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
- Callow NH, Callow RK, Emmens CW. Colorimetric determination of substances containing the grouping -CH(2).CO- in urine extracts as an indication of androgen content. *Biochem J.* 1938 Aug;32(8):1312–1331. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
- ENGEL LL, SLAUNWHITE WR, Jr, CARTER P, NATHANSON IT. The separation of natural estrogens by countercurrent distribution. *J Biol Chem.* 1950 Jul;185(1):255–263. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
- HOWARD GA, MARTIN AJP. The separation of the C12-C18 fatty acids by reversed-phase partition chromatography. *Biochem J.* 1950 May;46(5):532–538. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
- KRITCHEVSKY TH, TISELIUS A. Reversed phase partition chromatography of steroids on silicone-treated paper. *Science.* 1951 Sep 21;114(2960):299–300. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
- NYC JF, MARON DM, GARST JB, FRIEDGOOD HB. Chromatographic separation of estrone, estradiol and estriol. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1951 Jul;77(3):466–469. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
- Reiss M, Hemphill RE, Gordon JJ, Cook ER. Regulation of urinary steroid excretion. 1. Effects of dehydroisoandrosterone and of anterior pituitary extract on the pattern of daily excretion in man. *Biochem J.* 1949;44(5):632–635. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
- WINTERINGHAM FPW, HARRISON A, BRIDGES RG. Analysis of DDT derivatives by reversed-phase paper partition chromatography. *Nature.* 1950 Dec 9;166(4232):999–999. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
- ZAFFARONI A, BURTON RB, KEUTMANN EH. Adrenal cortical hormones; analysis by paper partition chromatography and occurrence in the urine of normal persons. *Science.* 1950 Jan 6;111(2871):6–8. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
- BURTON RB, ZAFFARONI, KEUTMANN EH. Paper chromatography of steroids. II. Corticosteroids and related compounds. *J Biol Chem.* 1951 Feb;188(2):763–771. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1198212/>

CROMATOGRAFIA IONICA (IC)



La cromatografia ionica è una tecnica di separazione analitica basata su equilibri di scambio che si realizzano tra ioni, fissati su un supporto solido e ioni presenti in soluzione, all'interno di una colonna cromatografica

Miscela

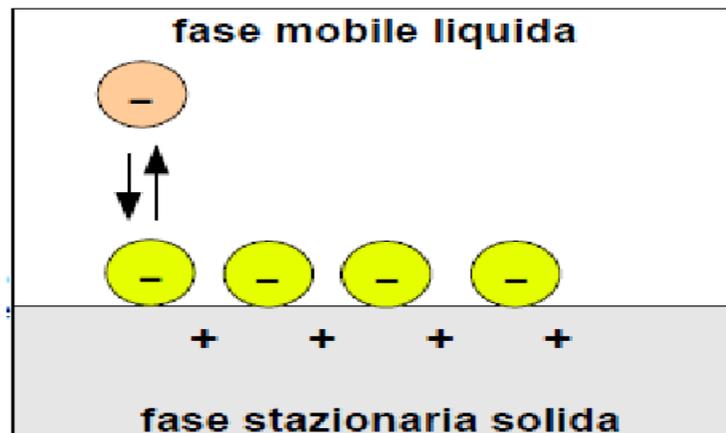
Sostanze organiche

Sostanze inorganiche

Scambio

Scambio cationico

Scambio anionico



SOPPRESSORE:

Dotato di una membrana a scambio ionico. Strumento finalizzato all'abbattimento delle cariche degli eluenti

PRE-COLONNA:

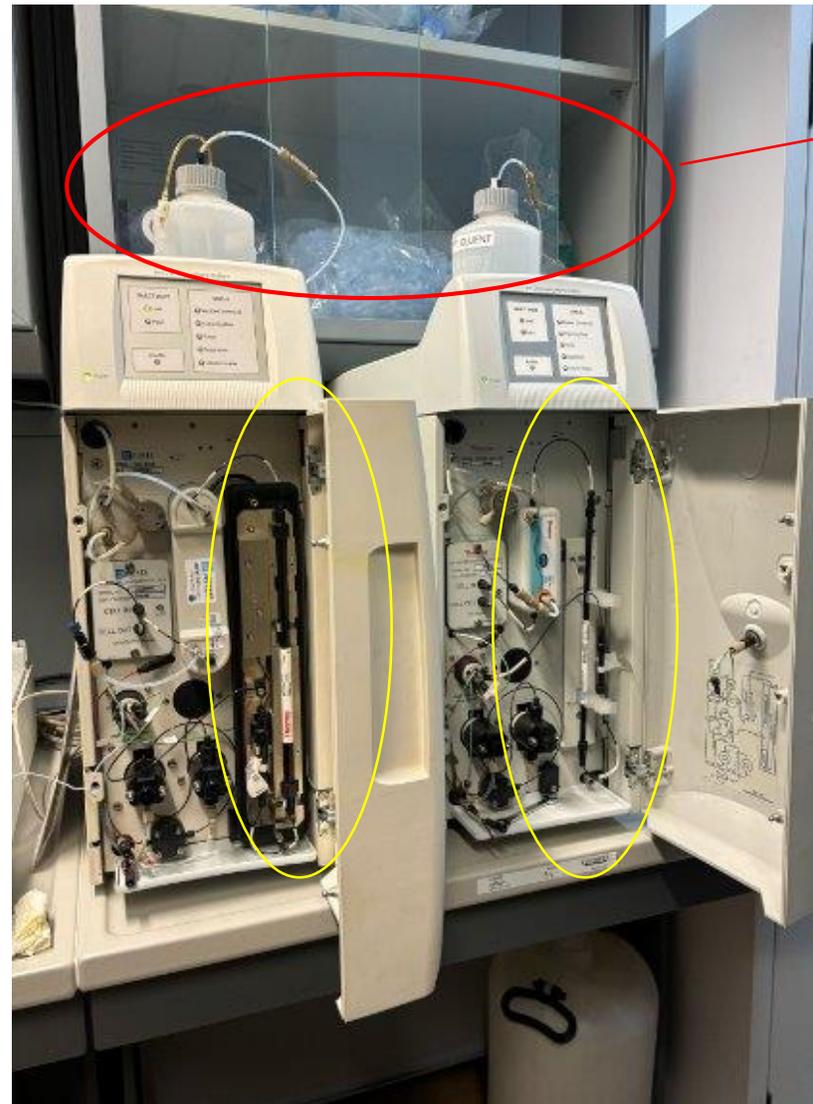
Per dare una pre-separazione

COLONNA:

Separazione delle diverse specie

SISTEMA DI RILEVAZIONE:

Ci consente di quantificare



ELUENTE:

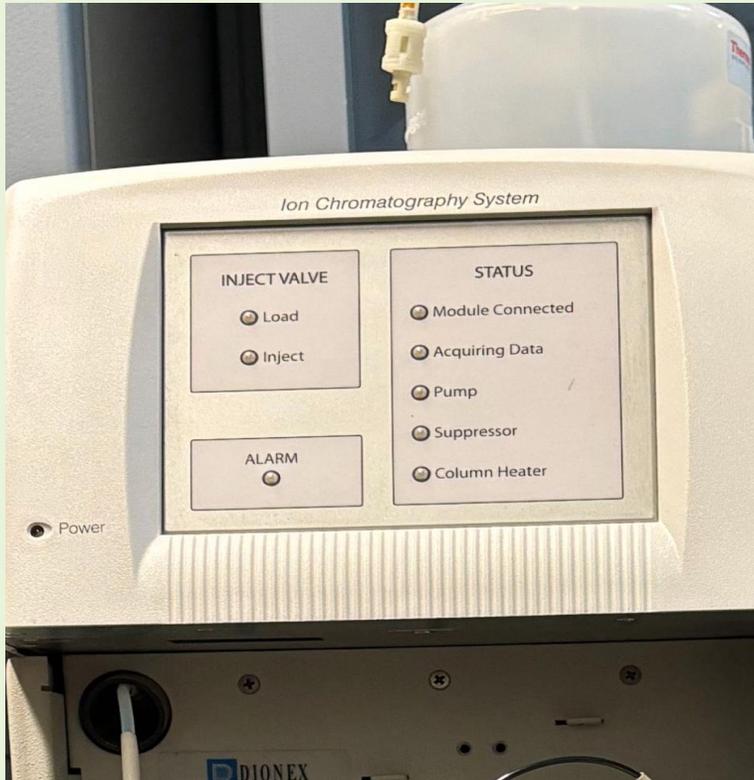
Situato nei recipienti sulle macchine.

ANIONI --> soluzione tampone a pH costante carbonato-bicarbonato

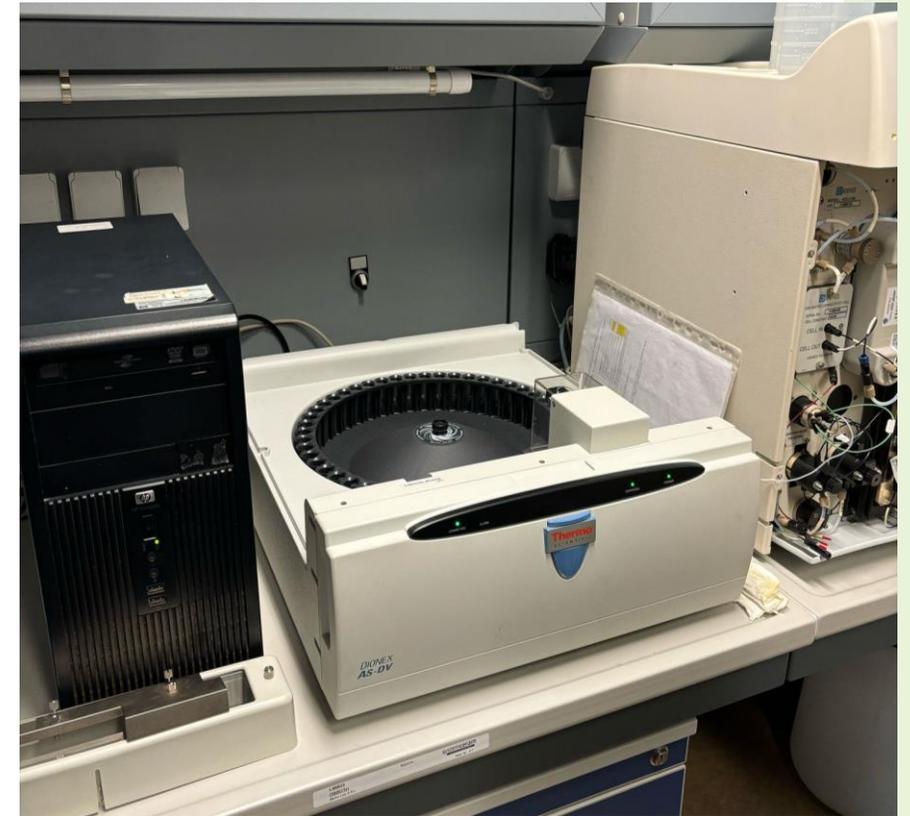
CATIONI --> acido metansolforico diluito

CONDUTTIMETRO:

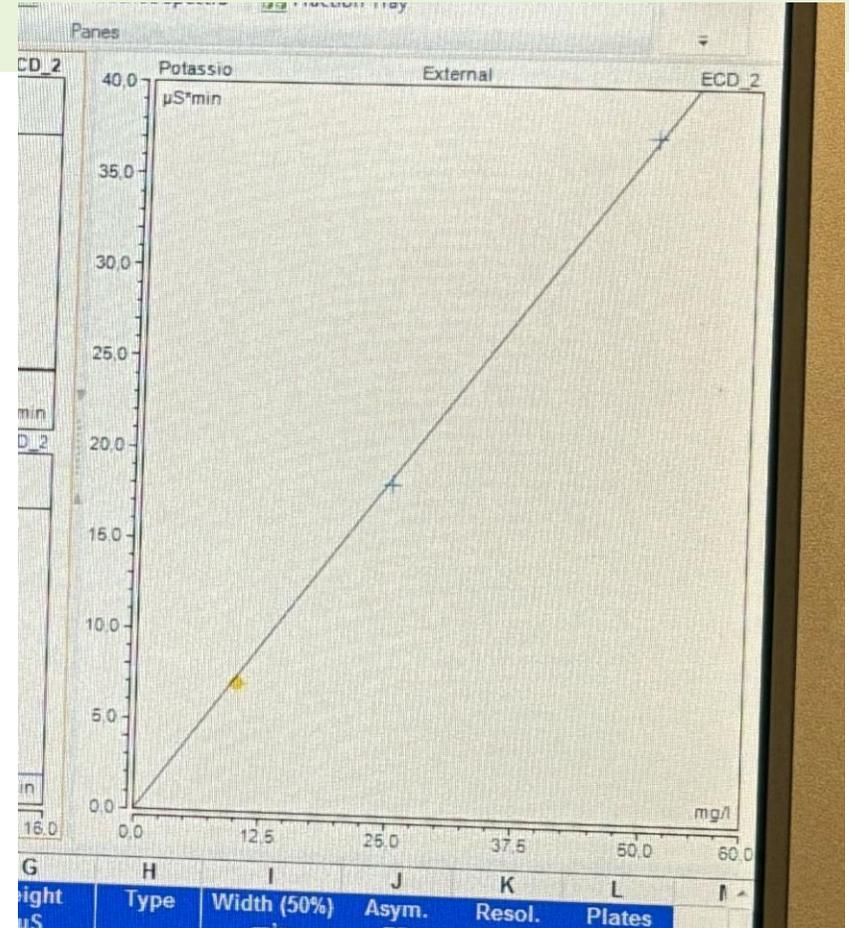
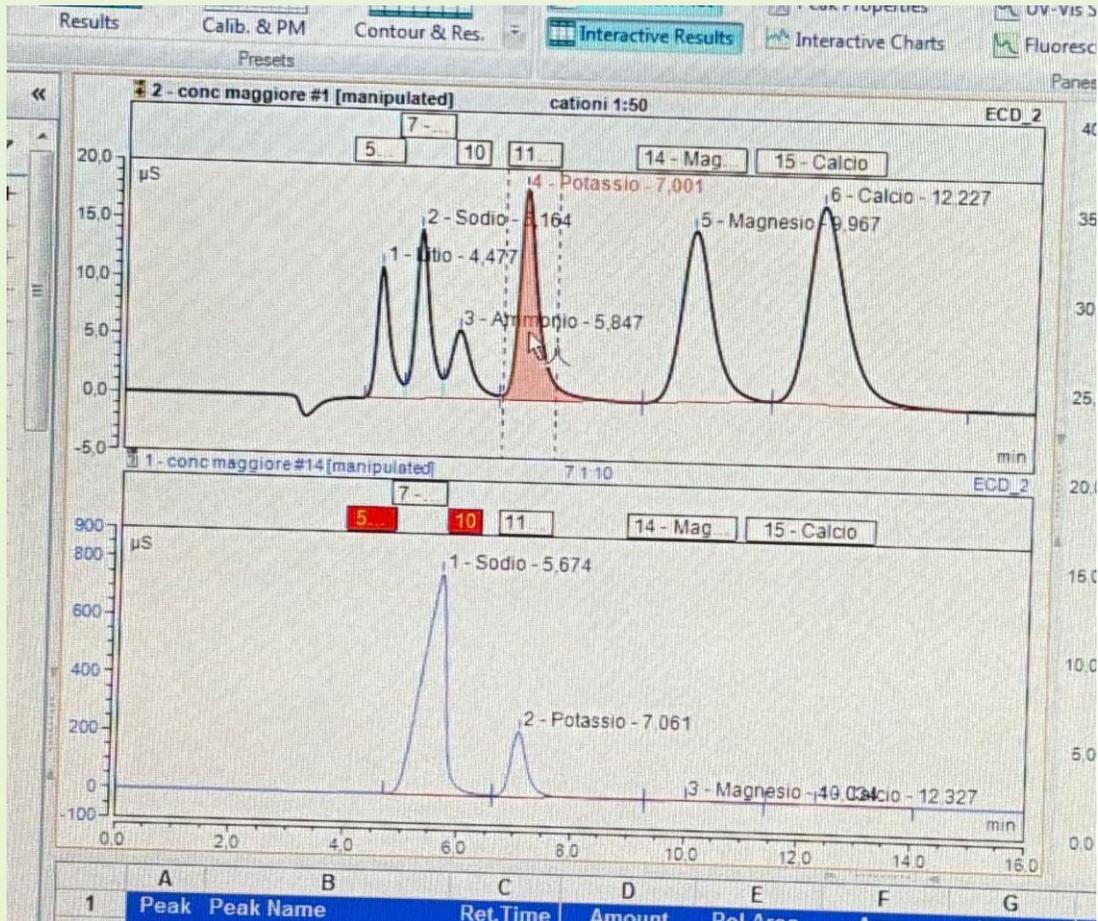
Segnale che legge la corrente elettrica



**MODULE CONNECTED
ACQUIRING DATA
PUMP
SOPPRESSOR
COLUMN HEATER**



AUTOCAMPIONATORE: strumento in cui è possibile immettere un gran numero di campioni, in questo caso fino a 50, riducendo i tempi di lavoro



Peak No.	Peak Name	Ret. Time min	Amount mg/l	Rel. Area %	Area $\mu\text{S} \cdot \text{min}$	Height μS	Type	Width (50%) min	Asym. EP	Resol. EP	Plates
1	Litio	4.477	1.0090	7.57	2.9765	11.30	BM*	0.224	n.a.	1.71	2223
2	Sodio	5.164	4.5496	10.90	4.2854	14.56	M	0.249	n.a.	1.30	2379
3	Ammonio	5.847	4.6252	6.45	2.5365	5.95	M	0.373	n.a.	1.98	1359
4	Potassio	7.001	9.5083	17.93	7.0508	18.23	M	0.315	1.62	3.95	2740
5	Magnesio	9.967	4.8821	24.12	9.4836	14.76	M	0.572	1.30	2.13	1680
6	Calcio	12.227	9.9990	33.03	12.9896	17.01	M	0.678	1.40	n.a.	1802
10	Maximum		9.9990	33.03	12.9896	18.23		0.678	1.40	n.a.	1802
11	Minimum		1.0090	6.45	2.5365	5.95		0.678	1.62	3.95	2740
12	Sum		34.5732	100.00	39.3223	81.80		0.224	1.30	1.30	1359

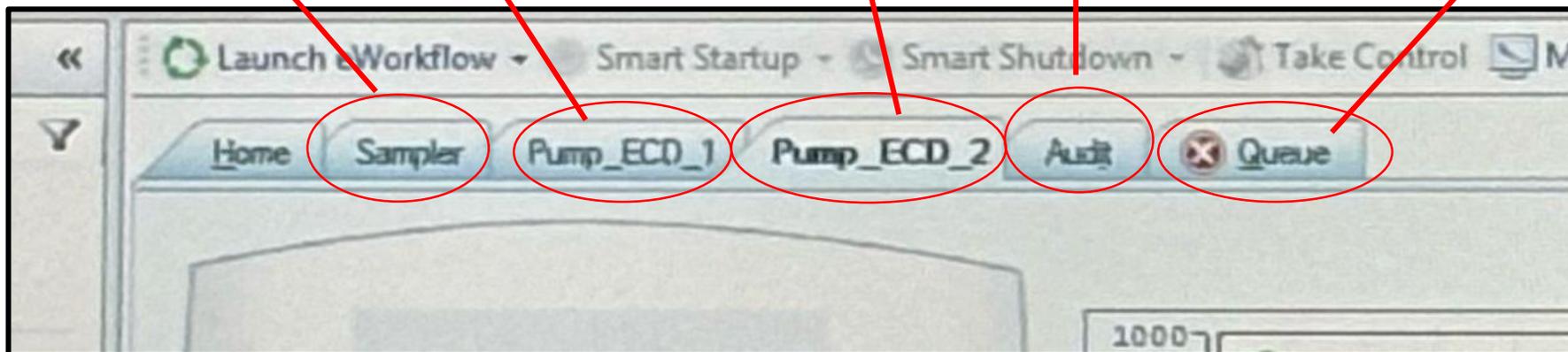
Interfaccia seconda
pompa

Schermata che collega
all'autocampionatore

Messaggi sulle
ultime operazioni

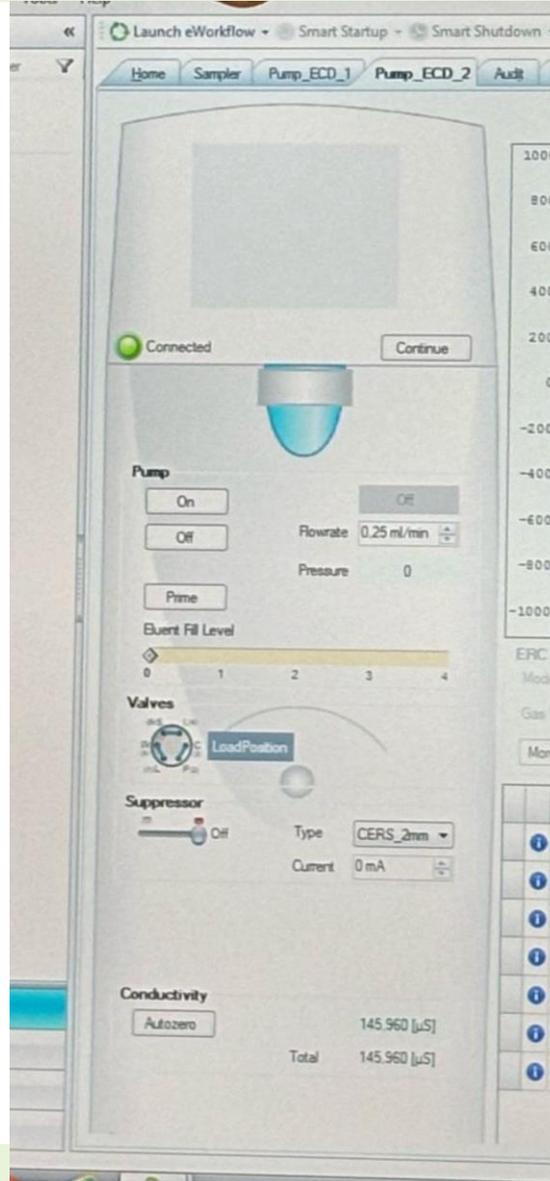
Interfaccia della
prima pompa

problemi



ECD1

- Velocità di flusso: 1,20mL/min
- Pressione: 1200-1300 psi
- Conducibilità colonna: 20 μ S
- Conducibilità soppressore: 33 mA



ECD2

- Velocità di flusso: 0,25 mL/min
- Pressione: 800-900 psi
- Conducibilità colonna: 2-3 μ S
- Conducibilità soppressore: 15 mA

CAMPI DI APPLICAZIONE

Le analisi più comuni con questa tecnica riguardano:

- Acque potabili
- Acqua di mare
- Acque reflue
- Acqua piovana
- Determinazione di specie in tracce in elettronica e centrali elettriche
- Controllo di qualità e analisi delle impurità
- Analisi elementare (Wickbold & Schoeninger)
- Prodotti farmaceutici
- Analisi delle urine

Application of Ion Chromatography for the Determination of Inorganic Ions, Especially Thiocyanates, in Human Semen Samples as Biomarkers of Environmental Tobacco Smoke Exposure

Ilona Demkowska^{1,*}, Żaneta Polkowska¹, Bogumiła Kielbratowska², and Jacek Namieśnik¹

¹Department of Analytical Chemistry, Chemical Faculty, Gdańsk University of Technology, Gdańsk, Poland and

²Department of Obstetrics, Medical University of Gdańsk, Gdańsk, Poland

C30

LA CROMATOGRAFIA IONICA COME TECNICA DI CONFERMA PER LA DETERMINAZIONE DEI POLIFOSFATI NEGLI ALIMENTI DI ORIGINE ANIMALE

G. Berardi, A. Di Taranto, V. Vita, E. Palomba, G. Rizzi, M. Iammarino

Istituto zooprofilattico sperimentale della Puglia e della Basilicata, Foggia, Italy

Risultati ottenuti dalle analisi di 238 campioni di prodotti di origine animale per la determinazione di polifosfati

CATEGORIA PRODOTTO	N° CAMPIONI ANALIZZATI	N°>LOQ	% >LOQ	CONCENTRAZIONI (g kg ⁻¹)
PESCE	57	1	1.7	0.3
SURIMI	7	4	57.1	0.1 - 0.5 - 0.3 - 0.5
CROSTACEI	6	1	16.7	0.1
MOLLUSCHI	16	0	0	-
PREPARAZIONI A BASE DI PESCE	10	1	10.0	1.8
PREPARAZIONI A BASE DI CARNE	15	0	0	-
PRODOTTI CARNEI	25	1	4.0	4.7
FORMAGGIO SEMISTAGIONATO	33	0	0	-
FORMAGGIO FUSO	20	4	0	1.5 - 0.1 - 0.4 - 0.1
FORMAGGIO MOLLE	17	0	0	-
FORMAGGIO SPALMABILE	13	3	23.1	8.9 - 0.2 - 0.3
FORMAGGI A PASTA FILATA	19	0	0	-
				0.3 - 0.1 - 0.5 - 0.3
				0.5 - 0.1 - 1.8
TOTALE	238	15	6.3	4.7 - 1.5 - 0.3 - 0.4
				0.1 - 8.9 - 0.2 - 0.3



separations



Article

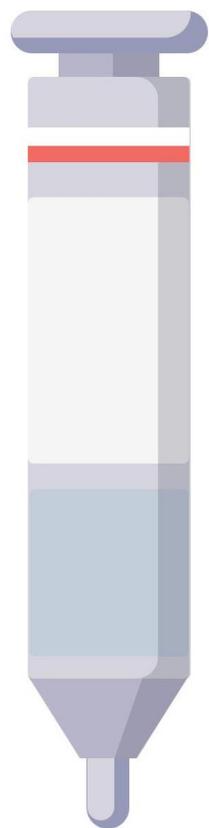
Green Aspects of Ion Chromatography versus Other Methods in the Analysis of Common Inorganic Ions

Rajmund Michalski *  and Paulina Pecyna-Utylska 

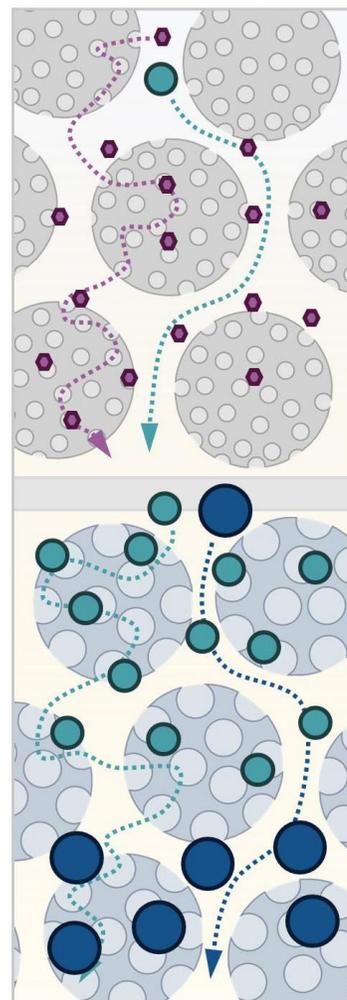
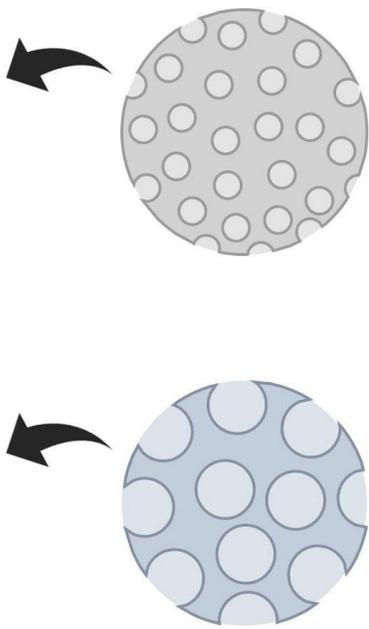
Institute of Environmental Engineering, Polish Academy of Sciences, Skłodowska-Curie 34 Street, 41-819 Zabrze, Poland; paulina.utylska@ipispan.edu.pl

* Correspondence: rajmund.michalski@ipispan.edu.pl

*Cromatografia
a esclusione*

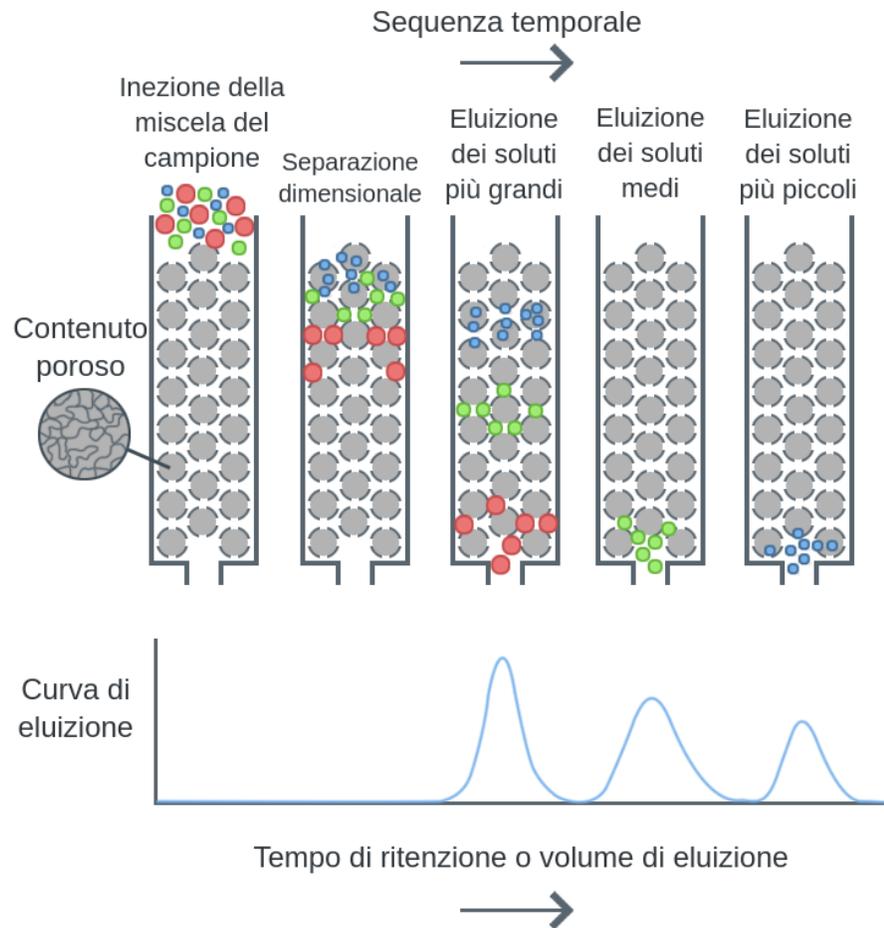


Dual sized
porous beads



Elution speed
difference
depending
on the size
of vesicles

Cromatografia a esclusione



La cromatografia a esclusione, chiamata anche gel cromatografia, è il metodo più usato per la separazione in base al peso molecolare.

Il concetto che sta alla base di questa separazione è molto semplice:

- la "**fase stazionaria**", ovvero la resina, è costituita da granuli di gel con pori di dimensione controllata.
- La "**fase mobile**" è un solvente organico o acquoso ed eluisce i soluti attraverso la colonna cromatografica.



Tipi di Cromatografia a esclusione

La cromatografia di esclusione si divide in:

Cromatografia di esclusione dimensionale

Cromatografia di filtrazione su gel

Cromatografia a permeazione di gel

La filtrazione su gel e la permeazione si ottengono solo se la fase fissa è un materiale rigido.

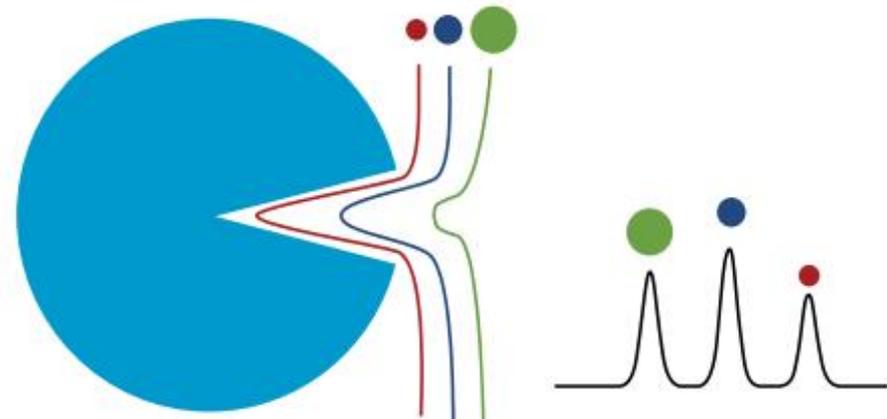
Avviene la filtrazione se si utilizza una fase mobile acquosa.

Avviene la permeazione se si utilizza una fase mobile organica.

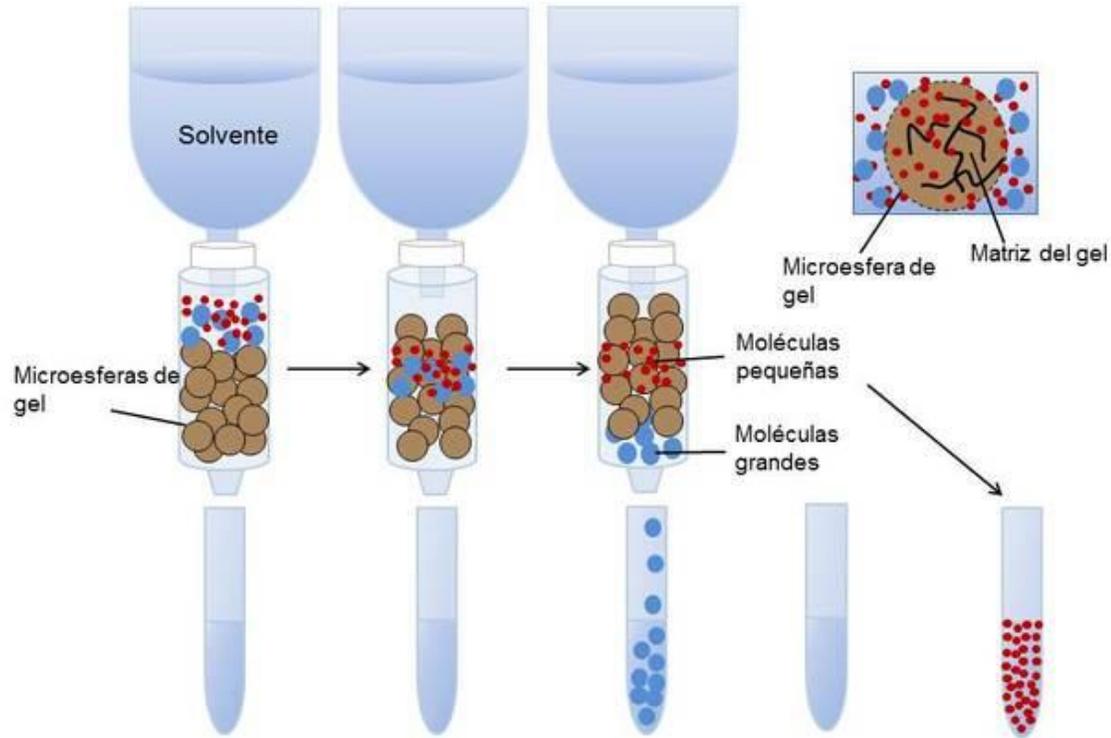
Cromatografia a esclusione dimensionale

Le molecole vengono separate dalla più grande alla più piccola in proporzione al loro peso molecolare in soluzione.

- Le molecole molto grandi sono escluse dal letto impaccato e vengono eluite per prime, nel volume morto.
- Le molecole più piccole saranno in grado di penetrare nei pori e diffondendo più in profondità verranno eluite per ultime.



Strumentazione e Materiali



Il processo viene condotto quasi sempre in una colonna e i materiali di impaccamento possono avere pori di dimensioni controllate.

I materiali possono essere gel soffici, semirigidi o rigidi.

- **GEL SOFFICI** (*polidestrano o agarosio*) si gonfiano fino a raggiungere molte volte il loro volume a secco
- **GEL SEMIRIGIDI** (*polivinilacetato o polistirene*) si gonfiano fino a 1,1-1,18 volte il loro volume a secco
- **GEL RIGIDI** (*vetri porosi o le perle di silice porosa*) hanno pori fissi e non si gonfiano.

Costante di distribuzione

- Nella cromatografia a esclusione la fase stazionaria è un gel più o meno poroso, i cui parametri fondamentali dipendono dalle caratteristiche dimensionali che il gel assume dopo che è stato introdotto in colonna e condizionato con l'eluente

Il Volume di eluizione di un soluto V_e dipende da:

- V_o volume esterno alle particelle di gel
- Kd il coefficiente di distribuzione del soluto
- V_i il volume interno alle particelle di gel

$$\underline{V_e = V_o + KdV_i}$$

L'espressione si riordina per dare:

$$\underline{Kd = (V_e - V_o) / V_i}$$

Per ciascun tipo di gel la distribuzione di un soluto tra il solvente interno alla particella di gel e quello esterno è definito dal **Coefficiente di distribuzione Kd**

$Kd = 0$ la molecola del soluto è grande e completamente esclusa dal solvente interno al gel

$Kd = 1$ la molecola di soluto è permeabile alle particelle di gel

$0 < Kd < 1$ La variabilità di Kd rende possibile la separazione.

Vantaggi della Cromatografia a esclusione

Versatilità: la cromatografia di esclusione può gestire una vasta gamma di dimensioni del campione e pesi molecolari, rendendolo adatto per biomolecole sia piccole che grandi.

Separazione delicata: a differenza di altre tecniche cromatografiche, la cromatografia di esclusione opera in condizioni lievi, preservando l'integrità e la funzionalità delle biomolecole sensibili.

Facile ridimensionamento: la cromatografia di esclusione può essere facilmente ridimensionata per scopi preparativi, consentendo la purificazione di quantità significative di una molecola bersaglio.



Limitazione Cromatografia a esclusione

- **Risoluzione limitata** mentre la cromatografia di esclusione è efficace nel separare le molecole in base alle dimensioni, può avere una risoluzione limitata quando si tratta di analiti di dimensioni simili.
 - In questo caso, le differenze nei tempi di eluzione tra queste molecole possono essere minime, portando a picchi sovrapposti e difficoltà nella quantificazione o nell'identificazione accurate.
- 

Campi di applicazione della cromatografia a esclusione

Purificazione delle proteine

Analisi dei polimeri

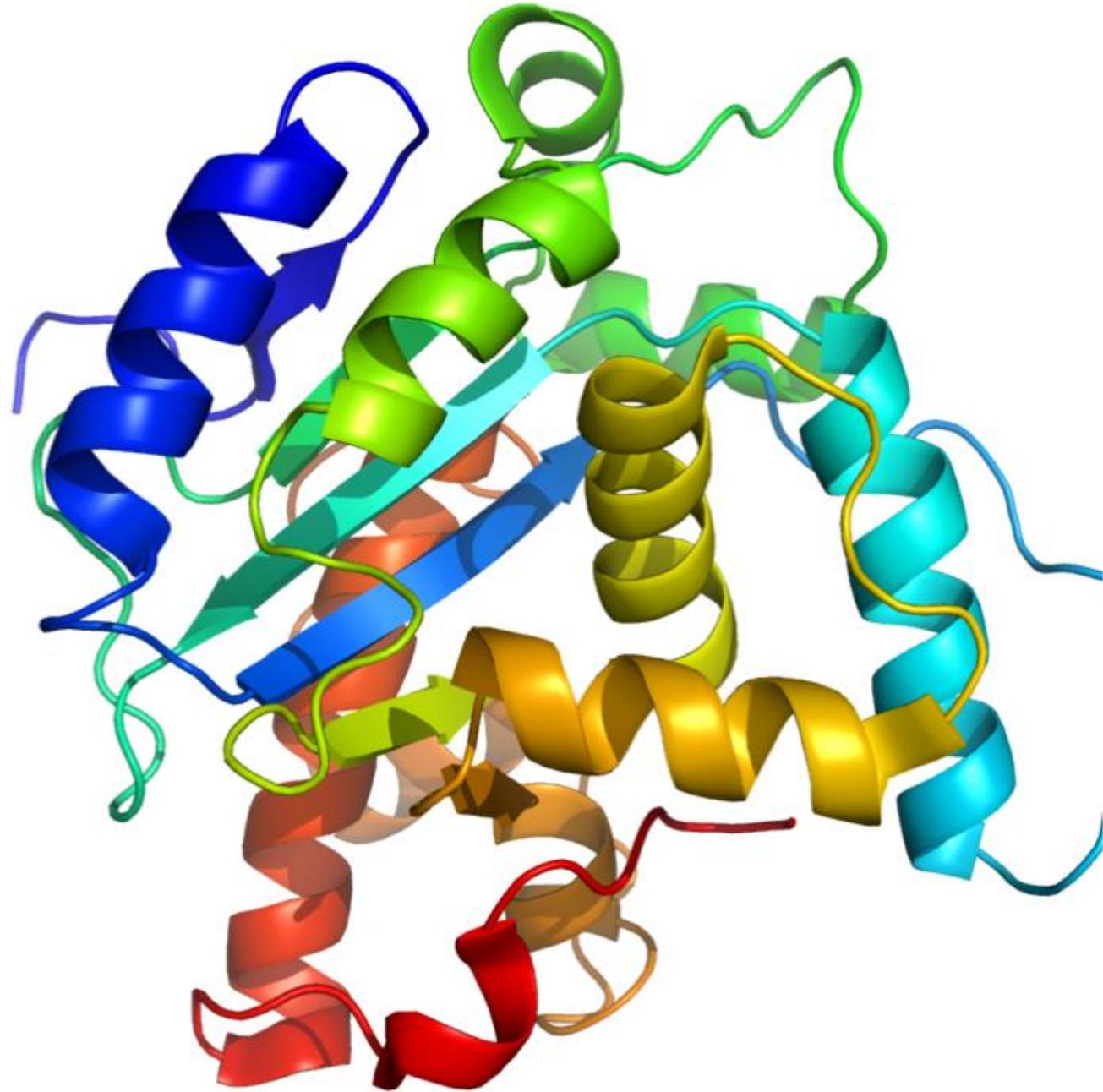
Analisi ambientale

industria alimentare e delle bevande

Biotechnologie

Purificazione delle proteine

- la cromatografia di esclusione svolge un ruolo cruciale nella purificazione delle proteine **separando le proteine bersaglio da impurità** come acidi nucleici, sali o altri contaminanti.
- la cromatografia di esclusione viene spesso impiegata per la produzione di anticorpi terapeutici.





Analisi polimeri

- La cromatografia di esclusione viene ampiamente utilizzata nella scienza dei polimeri per caratterizzare e analizzare i polimeri in base alla loro distribuzione del peso molecolare.
- Queste informazioni sono cruciali per comprendere le proprietà dei polimeri come **medie del peso molecolare e caratteristiche di ramificazione.**

Analisi ambientale

La cromatografia di esclusione trova l'applicazione nello studio degli inquinanti organici e dei contaminanti presenti nei campioni di acqua o suolo.

Utilizzando colonne specializzate piene di resine idrofobiche o altri materiali selettivi, vari composti possono essere separati in base alle loro dimensioni e idrofobicità.

Ciò consente ai ricercatori di identificare e **quantificare gli inquinanti** come **idrocarburi policiclici aromatici (IPA)** o **pesticidi nei campioni ambientali**.





Industria alimentare e delle bevande

- La cromatografia di esclusione è impiegata nel settore alimentare e delle bevande per il controllo di qualità, garantendo l'assenza di contaminanti o sostanze indesiderate.

Biotecnologie

- La cromatografia di esclusione svolge un ruolo vitale nell'elaborazione a valle durante la produzione di biofarmaci.
- È comunemente usato per lo scambio di tamponi, il desalting e per purificare biomolecole come proteine ricombinanti e enzimi.



Progressi e innovazioni

Risoluzione avanzata con fasi stazionarie avanzate:

- Sviluppo di nuove fasi stazionarie con proprietà migliorate.
- Risoluzione e selettività migliorate, consentendo una migliore separazione di miscele complesse.
- L'introduzione di **resine ad alte prestazioni** con dimensioni di particelle più piccole ha portato ad una maggiore efficienza e picchi più nitidi nei cromatogrammi.



Progressi e innovazioni

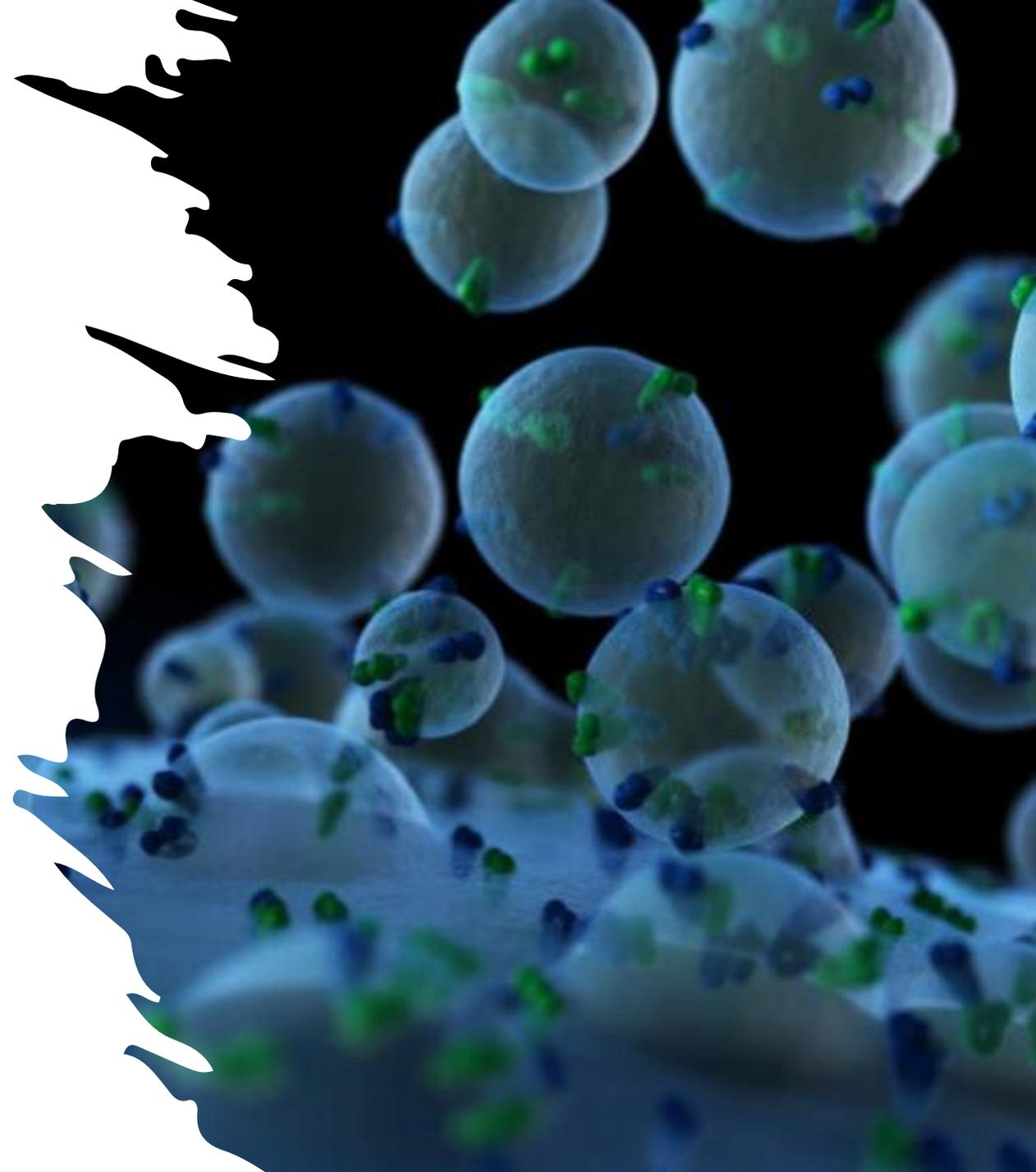
Miniaturizzazione:

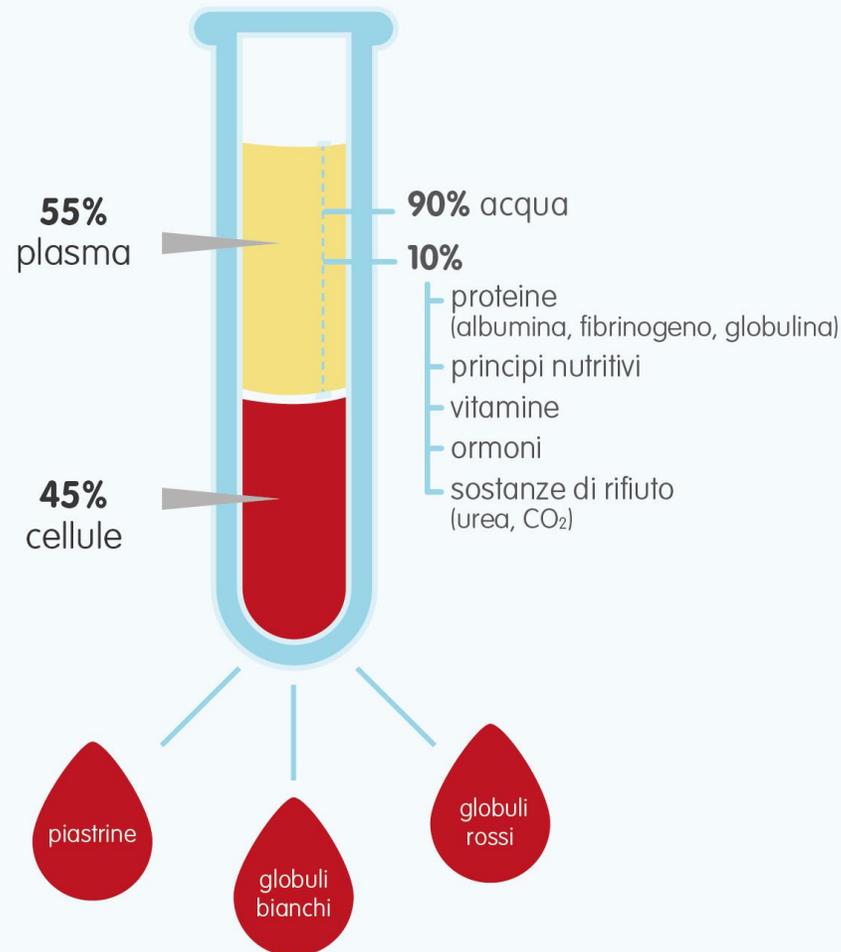
- La miniaturizzazione dei sistemi cromatografici è una tendenza tecnologica proiettata alla riduzione dei dispositivi a dimensioni minime senza che ne venga pregiudicata la funzionalità e l'efficienza.
- Sono state sviluppate colonne microscale e dispositivi microfluidici, consentendo ai ricercatori di eseguire analisi utilizzando volumi di campioni più piccoli e riducendo i tempi di analisi.



Articolo scientifico: Isolamento delle vescicole extracellulari tramite SEC

- **Le vescicole extracellulari (EV)** sono compartimenti o particelle derivate dalle cellule.
- Gli **EV** potrebbero essere approssimativamente classificati come esosomi e microvescicole (MV) in base alla loro biogenesi e caratteristiche.
- Le vescicole sono strumenti promettenti nella diagnosi e nel trattamento di varie malattie umane, poiché trasportano biomolecole derivate da tessuti e/o organi.
- Le ricerche sui biomarcatori stanno affrontando una serie di sfide, soprattutto nella standardizzazione dei metodi di isolamento e caratterizzazione verso applicazioni cliniche.





Articolo scientifico: Isolamento delle vescicole extracellulari tramite SEC

- l'isolamento delle vescicole dai fluidi corporei complessi si trova spesso in un dilemma tra purezza e facilità di funzionamento, che sono entrambi fondamentali per le applicazioni cliniche nel mondo reale.
- L'ultracentrifugazione (UC) è uno dei metodi più accettati per l'isolamento di EV con elevata purezza, però richiede molto tempo, con un basso tasso di recupero delle particelle
- La SEC può rimuovere in modo efficiente proteine con una purezza paragonabile alla UC, ma spesso richiede operazioni di frazionamento multiple utilizzando impostazioni di colonna diversificate.
- **L'obiettivo di questo studio è quello di stabilire un metodo SEC semplificato per acquisire vescicole di alta qualità.**

[J Vescicole extracellulari](#). 2021 settembre; 10(11): e12145.

ID PMC: PMC8435528

Publicato online il 12 settembre 2021. doi: [10.1002/jev2.12145](https://doi.org/10.1002/jev2.12145)

PMID: [34514732](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34514732/)

Istituzione di una cromatografia dicotomica ad esclusione dimensionale semplificata per isolare vescicole extracellulari verso applicazioni cliniche

[Jiahui Guo](#) , ¹ [Caihong Wu](#) , ¹ [Xinyi Lin](#) , ¹ [Jian Zhou](#) , ¹ [Jiayi Zhang](#) , ¹ [Wenting Zheng](#) , ¹ [Tong Wang](#) , ¹ e [Yizhi Cui](#) ¹✉

CONCLUSIONI

Le resine Sepharose reticolate CL-6B e CL-4B hanno mostrato prestazioni superiori rispetto a CL-2B in termini di risoluzioni e purezza degli EV più elevate.

Aumentando i volumi del letto a 20 ml, è stato possibile migliorare significativamente le risoluzioni delle colonne CL-6B e CL-4B.

L'analisi proteomica implicava che, sebbene i due metodi avessero capacità diverse nel rimuovere diverse proteine contaminanti dai veicoli elettrici, la SEC dicotomica e l'ultracentrifugazione potevano isolare i veicoli elettrici dal plasma umano con purezza comparabile.

Questa SEC dicotomica ha il suo intrigante potenziale per essere utilizzata per la preparazione dei veicoli elettrici verso test clinici e/o ricerca di base.

DONATORI

3 femmine e 1 maschio, di età compresa tra 24 e 32 anni, dieta normale, SANI.

Esperimento

Il volume del letto invece di 10 ml è stato impostato a 20 ml. (volume ottimizzato)

In questo studio sono state confrontate le prestazioni di tutte e tre le resine Sepharose CL, vale a dire CL-2B, CL-4B e CL-6B, seguite dall'ottimizzazione del volume del letto.

Con queste condizioni ottimizzate, 2 passaggi di eluizione in massa era sufficiente per l'isolamento delle vescicole da siero bovino fetale (FBS), siero umano (HS)

CROMATOGRAFIA DI AFFINITA'

Tecnica basata sull'utilizzo di una fase stazionaria costituita da una molecola organica (legante di affinità) legata ad un supporto solido

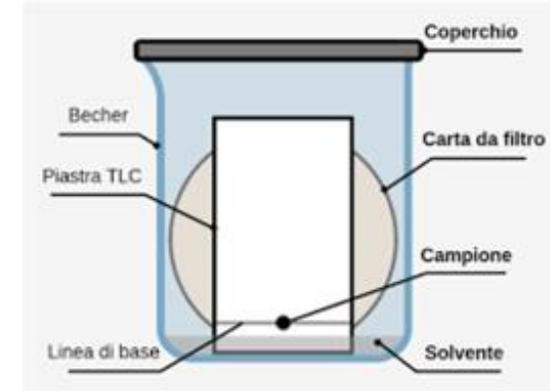
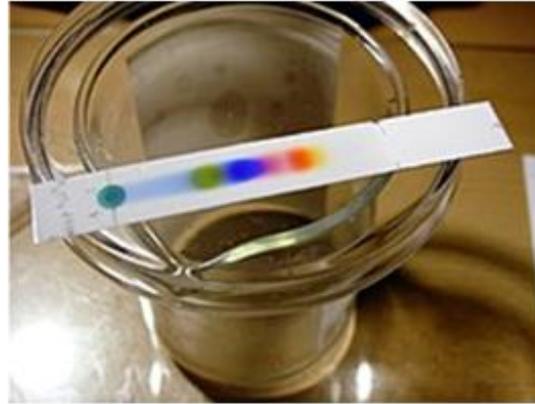
Attraversando la colonna, solo le molecole che si legano al legante di affinità sono trattenute.

Nella cromatografia di affinità abbiamo:

- **FASE STAZIONARIA** è tipicamente un solido con il legante
- **FASE MOBILE** solvente liquido

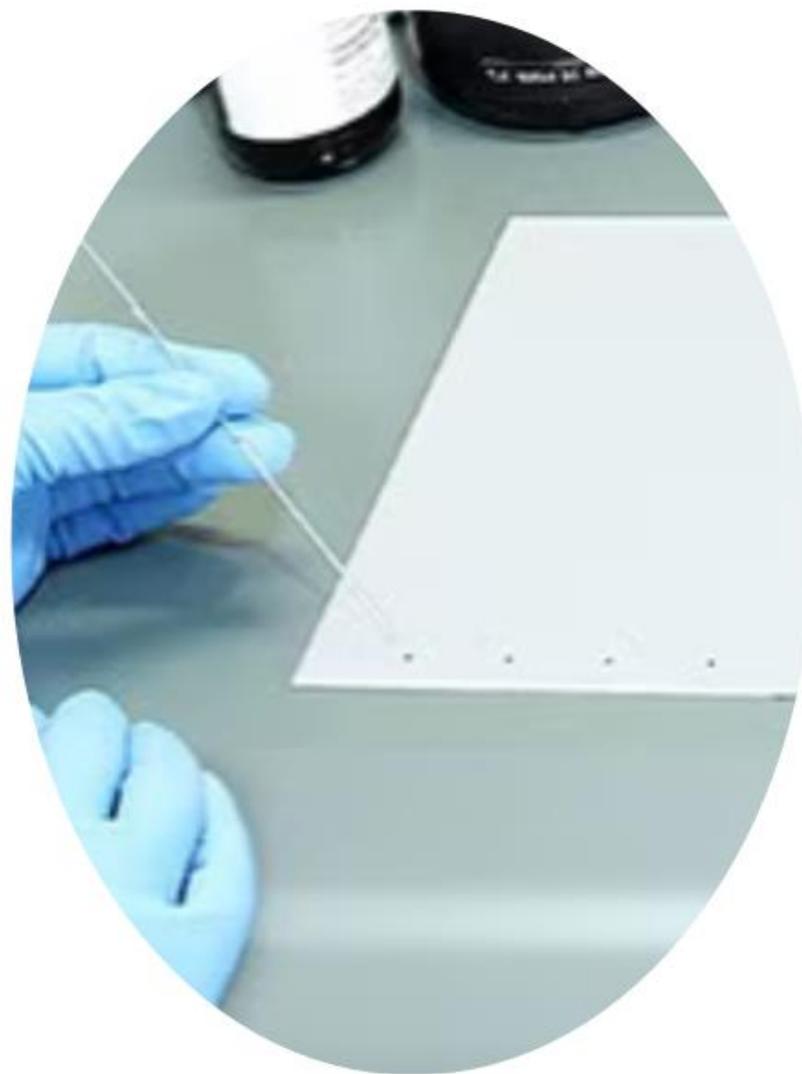
- **CROMATOGRAFIA SU STRATO SOTTILE (o TLC)**

- Tecnica cromatografica veloce e poco efficiente.
- Tale tecnica utilizza come fase stazionaria uno strato di materiale solido sottile supportato su una superficie di vetro o di metallo.



- **PREPARAZIONE DELLA LASTRA**
- Un impasto solido viene disteso su una lastra di vetro.
- Per fare aderire le particelle solide al vetro, spesso si aggiunge un legante.

- Possiamo trovare due tipologie di lastre:
 - *lastre convenzionali*
 - *lastre ad alta prestazione*

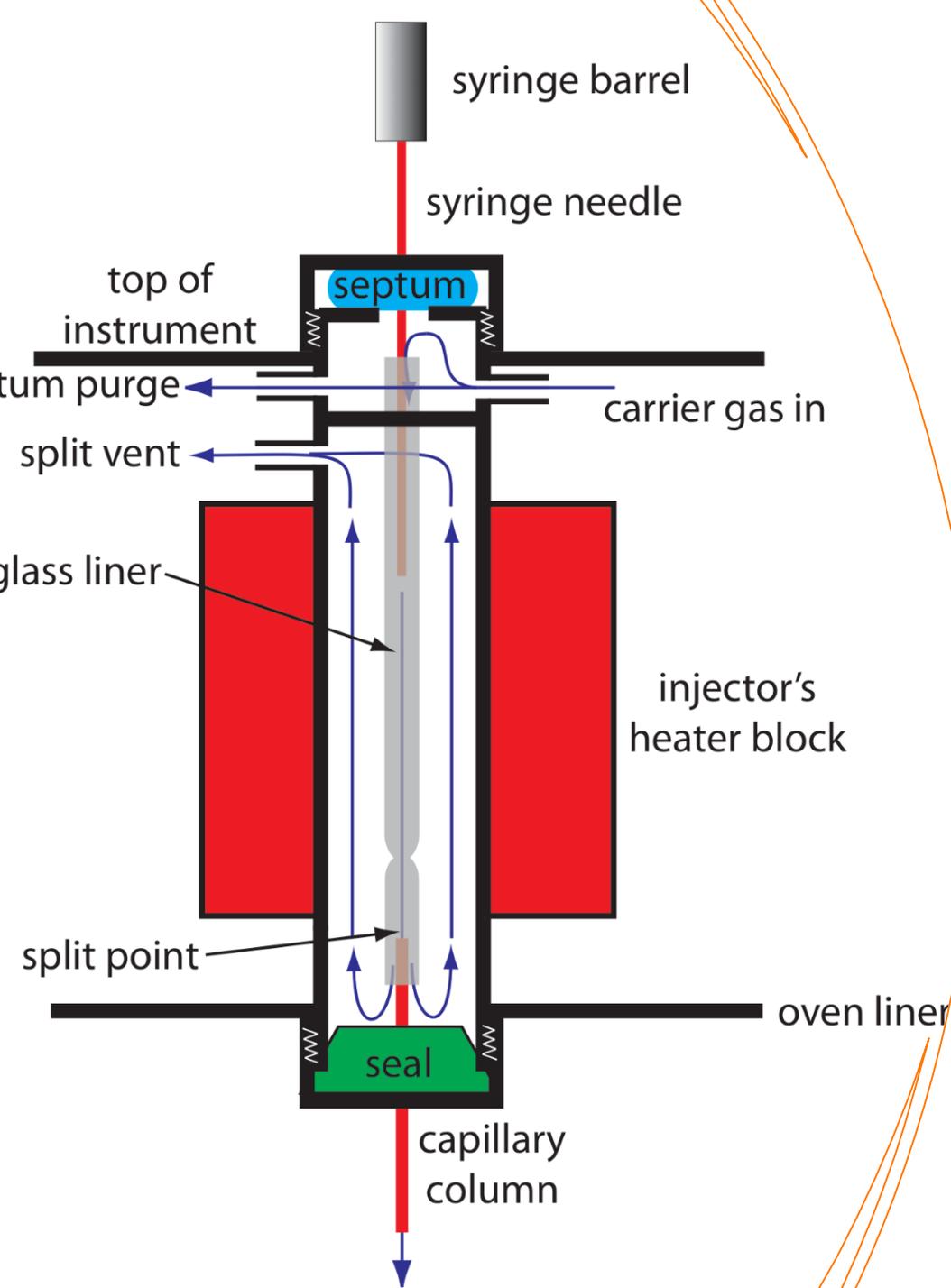


- **SVILUPPO DELLA LASTRA**

- Per sviluppare una lastra si pone una goccia di campione in prossimità del margine della lastra, detta linea di base e si procede utilizzando la fase mobile che separa i vari componenti in base alla diversa affinità con la fase mobile. Dopo la separazione viene rimossa la fase mobile per evaporazione e i componenti vengono evidenziati utilizzando un opportuno rivelatore.

- **FATTORI DI RALLENTAMENTO (R_F)**
- Fattore utilizzato per rilevare i componenti separati
- $R_F = d_R / d_M$
- R_F può variare da un valore di 1 fino a un valore 0.
- **FATTORE DI RITENZIONE**
- I ***fattori di ritenzione*** possono essere utilizzati nel metodo della cromatografia su colonna, ma è molto più efficiente e risolutivo ricavarli mediante cromatografia su strato sottile.
-
- $K = (d_M - d_R) / d_R$
-





GASCROMATOGRAFIA

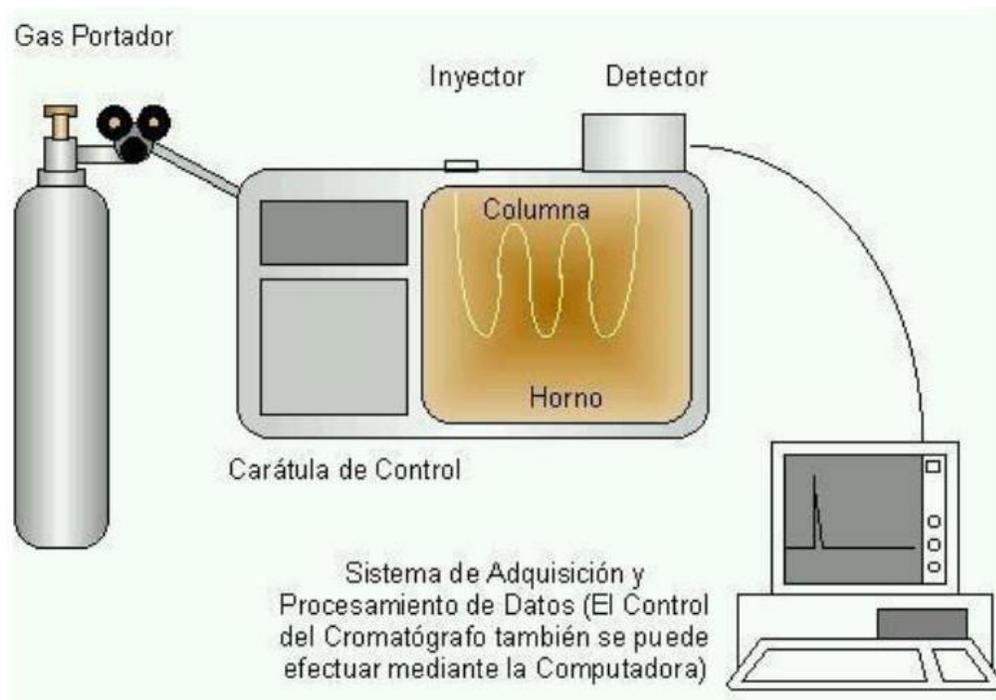
La **gascromatografia (GC)** è una tecnica analitica utilizzata per separare ed analizzare i composti volatili e semivolatili di una miscela. È stata concepita per la prima volta da **Archer John Porter Martin e Richard Laurence Millington Synge** nel 1941.

La **fase mobile** è un gas che fluisce attraverso una colonna in cui si trova una **fase stazionaria**, la quale può essere un solido granulare poroso (**GSC**) oppure un liquido (**GLC**).

I meccanismi di separazione dei componenti della miscela sono determinati dalla fase stazionaria; quella mobile ha solo funzione di trasporto attraverso la colonna.

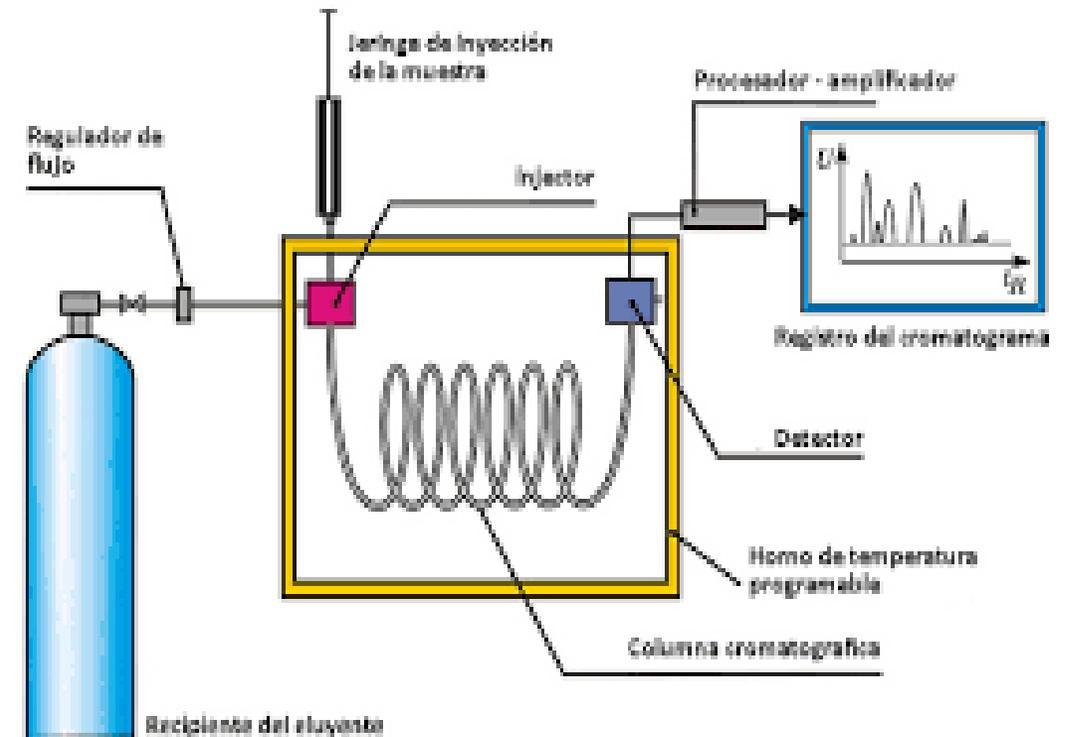
CROMATOGRAFIA GAS-SOLIDO (GSC)

- Si basa sull'**adsorbimento** delle sostanze gassose su superfici solide
- La fase mobile è gassosa; la fase stazionaria è solida, sulla cui superficie si trovano siti attivi che stabiliscono legami secondari (dipolo-dipolo, ponte idrogeno, Van der Waals)



CROMATOGRAFIA GAS-LIQUIDO (GLC)

- Si basa sulla **ripartizione** dell'analita tra una fase mobile ed una fase liquida
- La fase mobile è gassosa; la fase liquida è immobilizzata sulla superficie di un impaccamento solido inerte



VANTAGGI DELLA GC



Poco costosa

Altamente
sensibile

Robusta

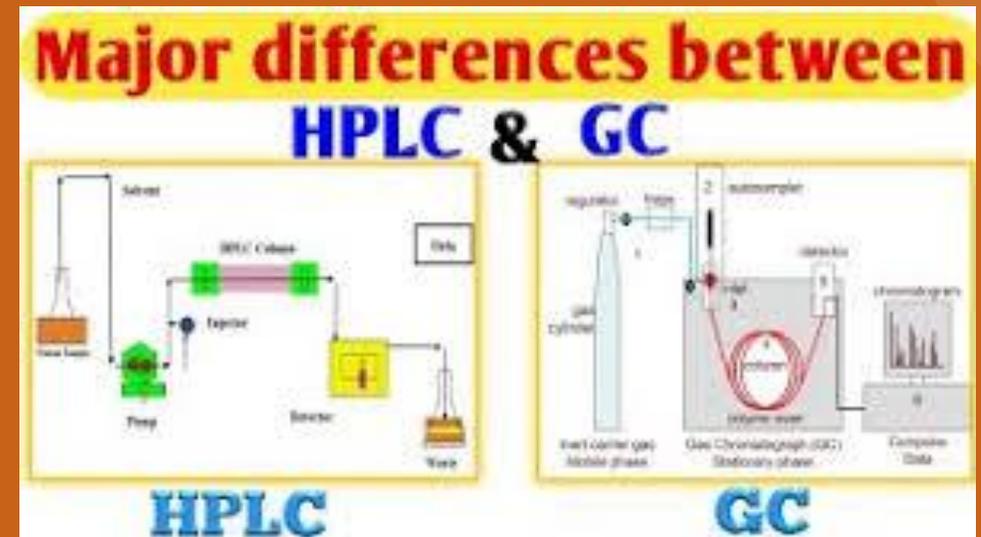
Riproducibile

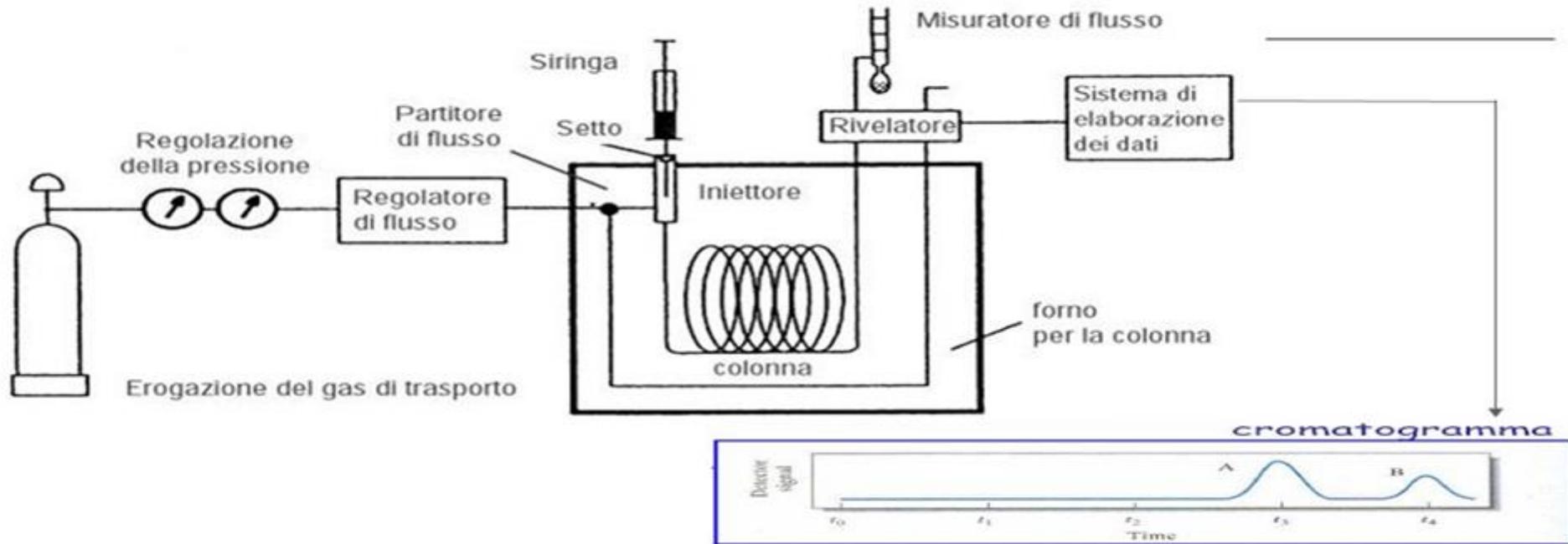
Rapida

Separazione di mix
complesse (100
analiti in GC
capillare)

SVANTAGGI DELLA GC

- ❖ Necessità di rendere volatili i campioni da analizzare, per cui in alcuni casi essa è soppiantata dall'HPLC (cromatografia liquida ad alto potere risolutivo)
- ❖ Non applicabile all'analisi di macromolecole, sostanze termolabili, altamente polari o idrofile



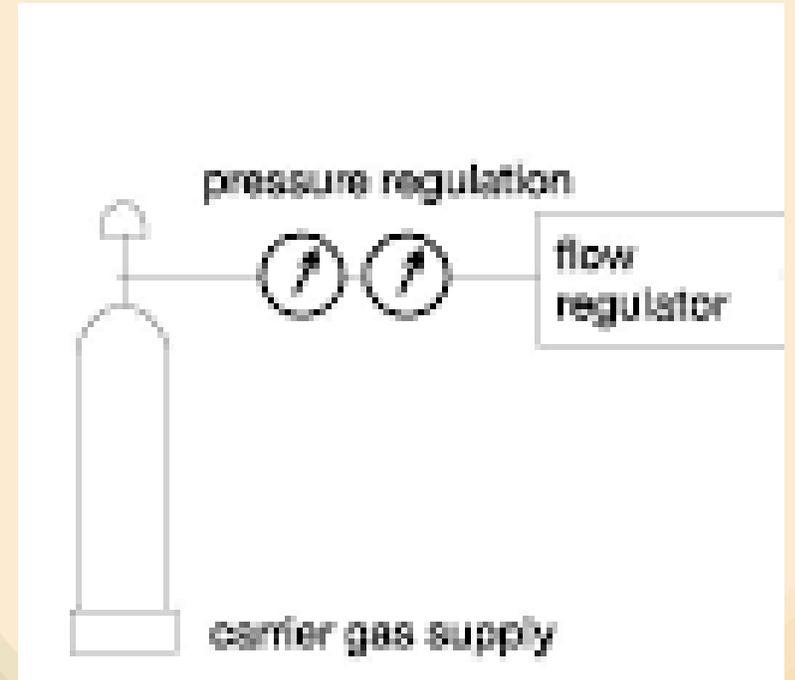


GASCROMATOGRAFO FUNZIONI:

- INTRODUZIONE DEL CAMPIONE
- EVAPORAZIONE DEL CAMPIONE
- INGRESSO DEL GAS DI TRASPORTO
- COLLEGAMENTO ALLA COLONNA

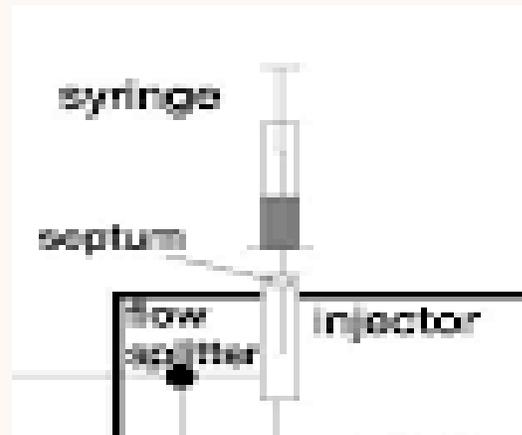
SISTEMA DI ALIMENTAZIONE GAS DI TRASPORTO (CARRIER)

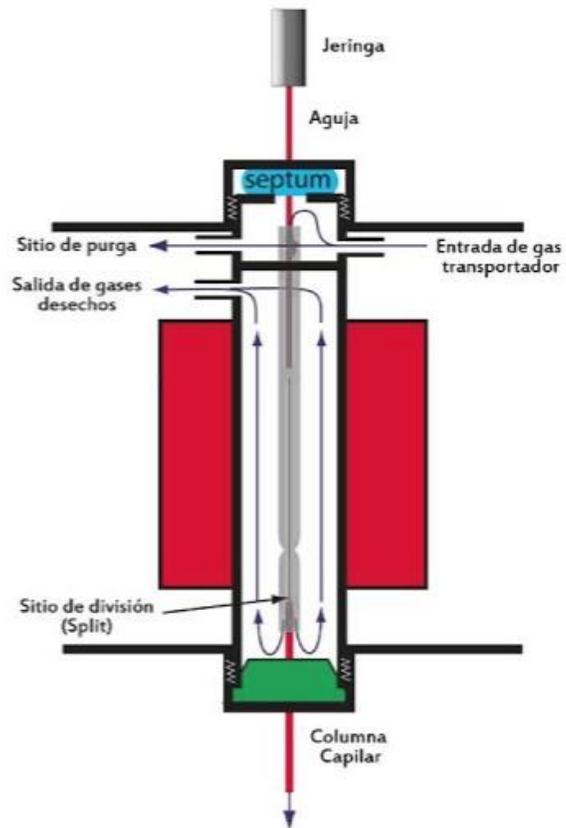
- Il *gas di trasporto* è inerte
- Il più comunemente usato è l'elio, disponibile in *bombole sotto pressione*
- Contiene un *setaccio molecolare* per rimuovere le impurità e l'acqua
- Trascina i componenti della miscela in analisi lungo la colonna cromatografica



INIETTORE O CAMERA DI INIEZIONE

- ✓ Assicura l'istantanea vaporizzazione del campione
- ✓ La camera di iniezione è dotata di resistenze variabili che permettono la fissazione della temperatura ritenuta più adatta per la vaporizzazione della miscela
- ✓ Esistono due tipi di iniezioni: *split* e *splitless*





Split

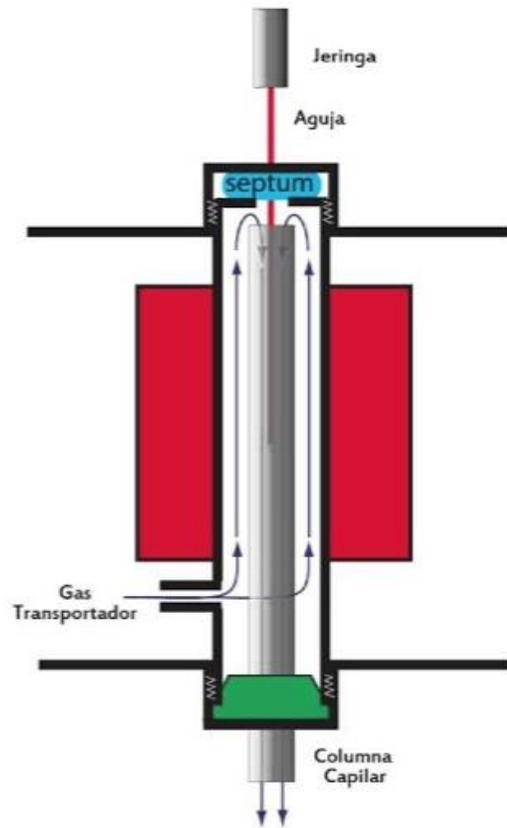
SPLIT

Si utilizza nel caso in cui il campione, a causa della sua alta concentrazione, potrebbe saturare la risposta del rilevatore

Diluisce il campione nel gas di trasporto

Libera una parte all'esterno, mediante sfiatatoio

Infine lo immette in colonna

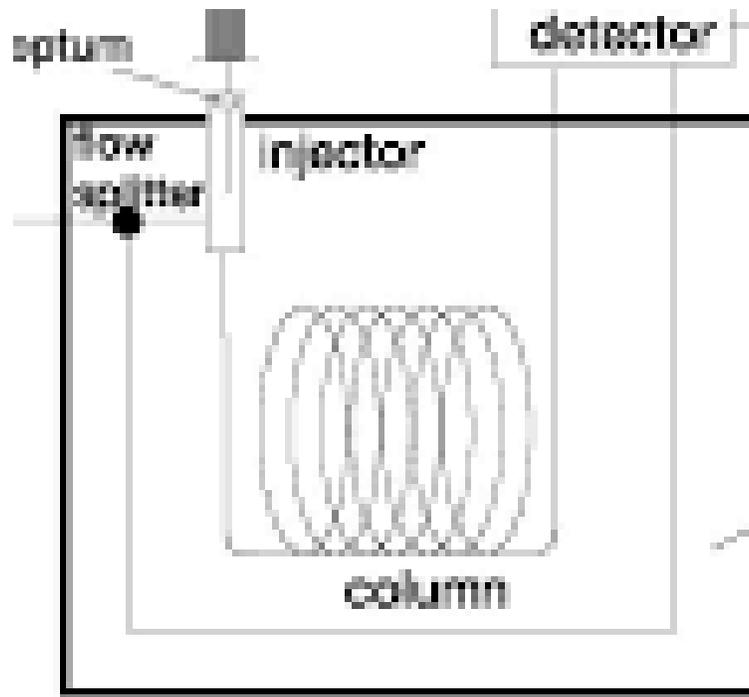


Splitless

SPLITLESS

Invia in colonna
direttamente tutto il
campione

Il solvente dovrebbe essere
sempre il primo ad arrivare
e a creare così un picco
visibile ed inconfondibile



COLONNA

Le colonne possono essere di due tipologie:

- ***Tubolari aperte o capillari***
- ***Impaccate***

La maggior parte delle colonne è fabbricata in silice fusa o acciaio inossidabile.

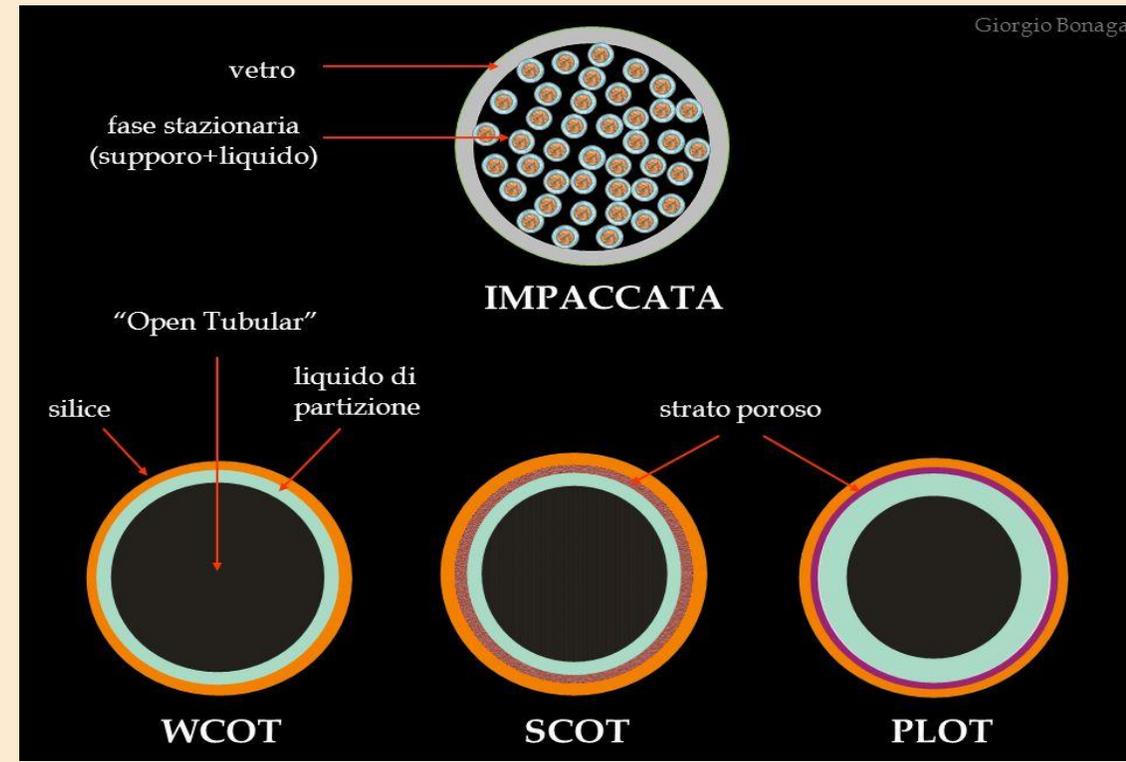
La colonna è alloggiata in un **forno termostato**, in genere a circolazione di aria calda, per permettere una buona stabilità di temperatura.

COLONNA CAPILLARE

- Esistono due tipi di colonna capillare: **tubulari aperte a parete rivestita (WCOT)** e **tubulari aperte a supporto rivestito (SCOT)**.
- Le **colonne capillari** più diffuse sono le **colonne tubulari a pareti rivestite in silice fusa (FSWC)**.
- In GC predominano queste in quanto, senza impaccatura, possono essere più sottili e lunghe e perciò più efficienti di quelle impaccate.

COLONNA IMPACCATA

- Sono fatte di tubi di vetro o di metallo, densamente impaccati con un supporto solido, rivestito di un sottile strato di **fase stazionaria liquida**.
- **La fase stazionaria** è continuamente attraversata dal **gas di trasporto (fase mobile)**



RIVELATORE

Dispositivo in grado di rilevare la presenza di una sostanza estranea nel gas di trasporto, a valle della colonna

Per poter essere *ideale*, dovrebbe seguire determinate caratteristiche:

- *Adeguata sensibilità*
- *Buona stabilità e riproducibilità*
- *Risposta lineare ai soluti*
- *Breve tempo di risposta*
- *Elevata attendibilità e facilità d'uso*
- *Non essere distruttivo*

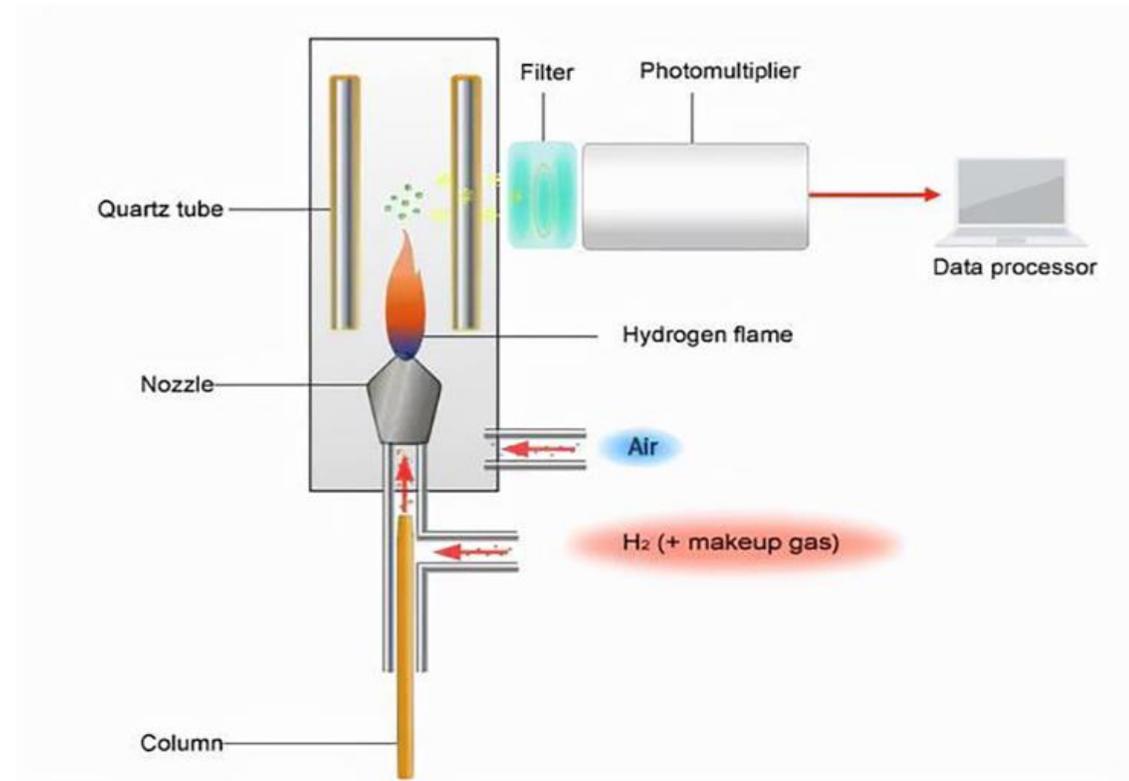
TRA I RIVELATORI PIU' USATI, SI SEGNALANO:

- ❖ **A IONIZZAZIONE DI FIAMMA (FID)**
- ❖ **A CONDUCEBILITA' TERMICA (TCD)**
- ❖ **A CATTURA DI ELETTRONI (ECD)**



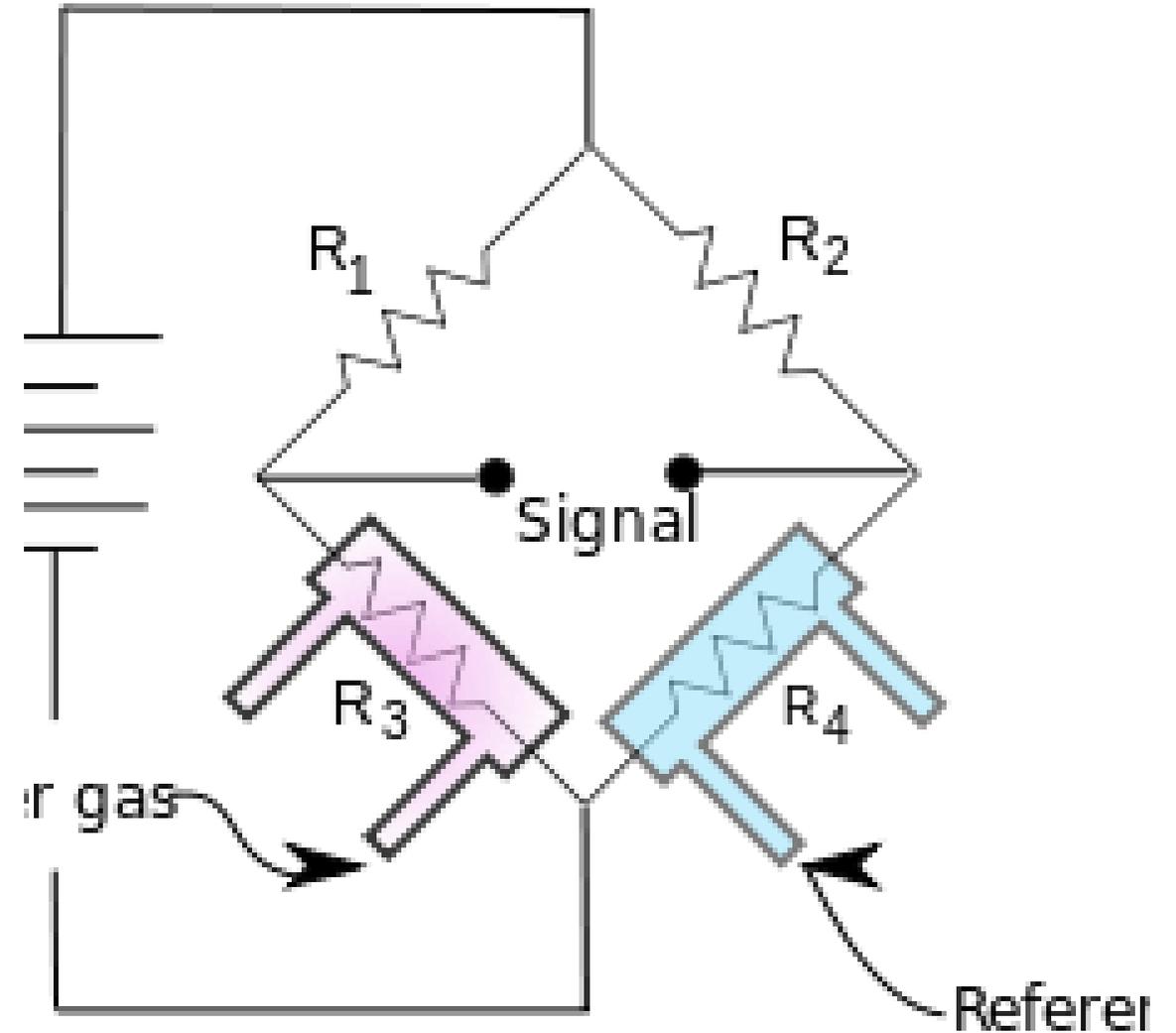
RIVELATORI A IONIZZAZIONE DI FIAMMA

- Rivelatore **universale** ma **distruttivo**, in quanto i campioni vengono bruciati per ottenere la trasformazione in ioni allo stato gassoso
- Strumento sensibile alla **massa** più che alla **concentrazione**
- L'effluente dalla colonna viene indirizzato in una piccola fiamma di idrogeno ed aria
- La maggior parte dei composti organici produce ioni ed elettroni
- Applicando poche centinaia di volt tra la punta del bruciatore ed un elettrodo collettore si provoca il movimento degli ioni e degli elettroni verso quest'ultimo
- La corrente risultante viene poi misurata con un picoamperometro



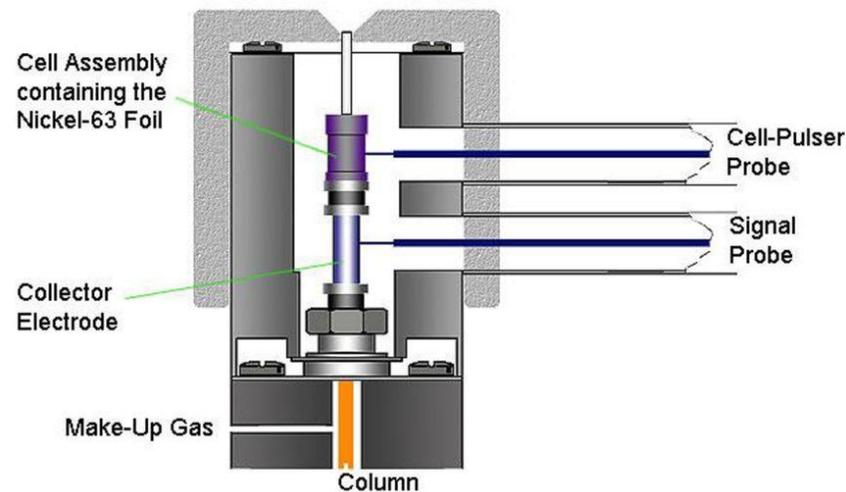
RIVELATORI A CONDUCEBILITA' TERMICA

- Rivelatore **universale** e non **distruttivo**
- Contiene una **sorgente riscaldata elettricamente**; l'elemento riscaldato può essere un sottile filo di platino o oro
- **La resistenza elettrica** dipende dalla conducibilità termica del gas
- Ci sono due **rilevatori accoppiati**, incorporati nei due bracci di un circuito a ponte
- **Gli effetti delle variazioni di temperatura, pressione e potenza elettrica** sono ridotti al minimo
- È semplice ed ha una risposta generale sia alle specie organiche che inorganiche, però ha un grande limite: **sensibilità relativamente bassa**



RIVELATORI A CATTURA DI ELETTRONI

Electron capture detector (ECD)

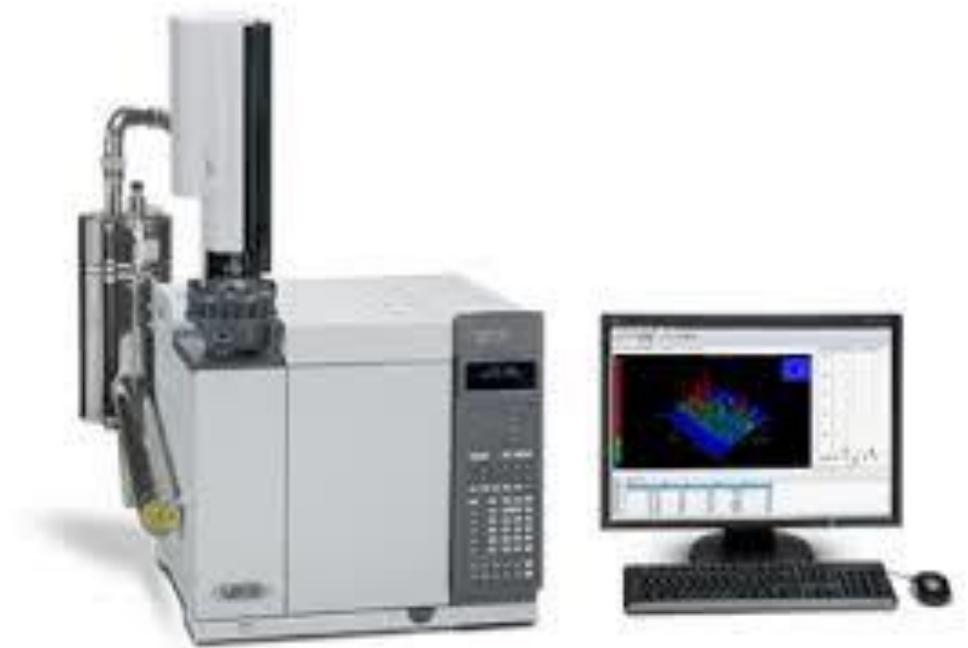


97

- Rivelatore *selettivo, sensibile* e non *distruttivo*
- L'eluato del campione, proveniente dalla colonna, viene fatto passare su di un **emettitore radioattivo di raggi beta**
- Un elettrone proveniente dall'emettitore provoca la ionizzazione del gas di trasporto (spesso azoto) e la produzione di un getto di elettroni
- In assenza di specie organiche provoca **una corrente costante stazionaria** tra una coppia di elettrodi
- La corrente diminuisce in presenza di molecole contenenti gruppi funzionali elettronegativi che tendono a catturare elettroni
- È insensibile a gruppi funzionali come le ammine, gli alcoli e gli idrocarburi

REGISTRATORE ED INTEGRATORE

- ❖ Il segnale in uscita dal rivelatore passa ad un registratore che ha il compito di realizzare il tracciato cromatografico
- ❖ I moderni strumenti sono corredati anche di un integratore che permette il calcolo automatico delle aree dei picchi, operazione indispensabile per effettuare analisi di tipo quantitativo
- ❖ I moderni strumenti sono collegati ad un computer che permette la gestione sia dei parametri strumentali che dei dati ottenuti



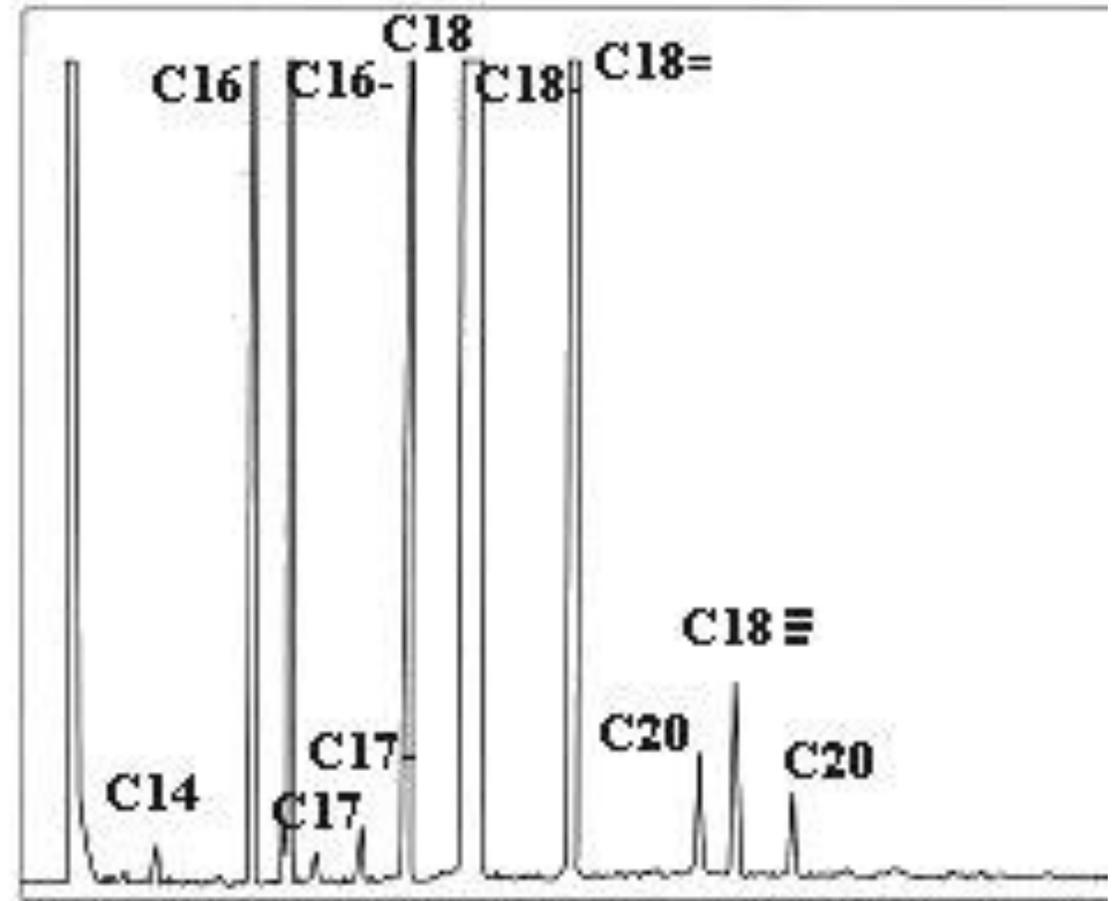
APPLICAZIONI ANALITICHE

La **gascromatografia** permette di effettuare analisi sia di tipo **QUALITATIVO**, che di tipo **QUANTITATIVO** (più utilizzata)



ANALISI QUALITATIVA

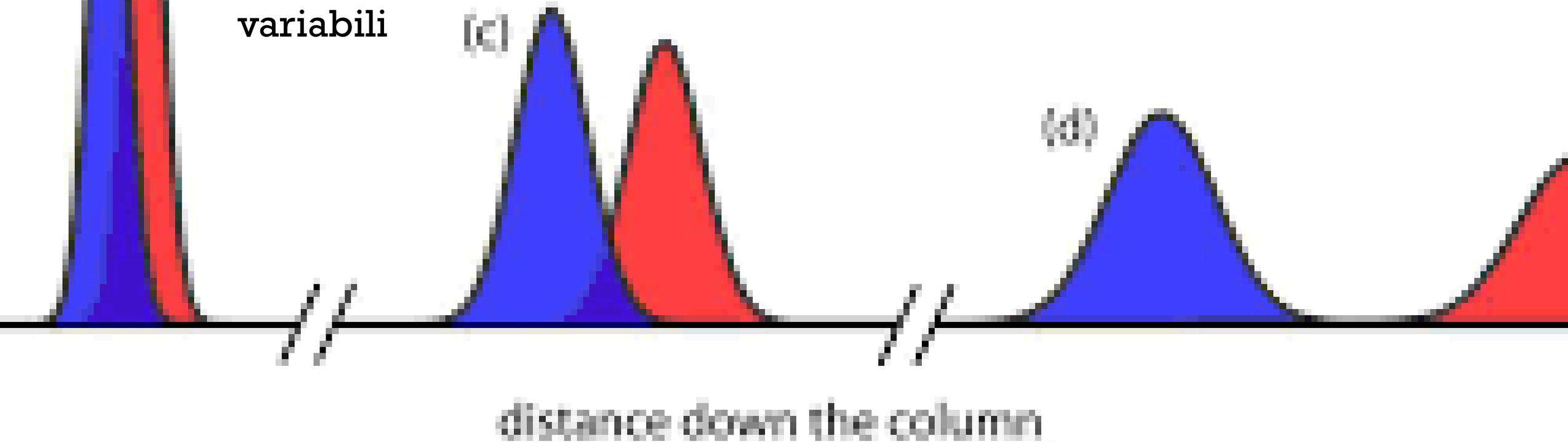
- Per stabilire la purezza dei composti organici sono molto usati i gascromatogrammi.
- La comparsa di picchi aggiuntivi rivela la presenza di eventuali contaminanti.
- Costituisce un eccellente metodo per confermare la presenza o meno di un composto sospetto nella miscela, **purché si abbia a disposizione un campione autentico della sostanza.**
- Per aggiunta del composto noto non dovrebbe comparire alcun picco nuovo nel cromatogramma della miscela, e si dovrebbe osservare l'aumento di un picco già esistente.



**Gascromatogramma di esteri metilici degli
grassi di tipico olio vergine d'oliva**

(b) ANALISI QUANTITATIVA

- Per le analisi quantitative e semiquantitative si è fatto largo uso dell'altezza dei picchi o dell'area del picco di una sostanza eluita da una colonna GC
- Si può ottenere un'accuratezza dell'1% relativo
- L'attendibilità è correlata in modo diretto con il controllo delle variabili



Vediamo il caso più semplice , che si può avere utilizzando un **FID** per la rivelazione degli idrocarburi o degli esteri metilici degli acidi grassi.

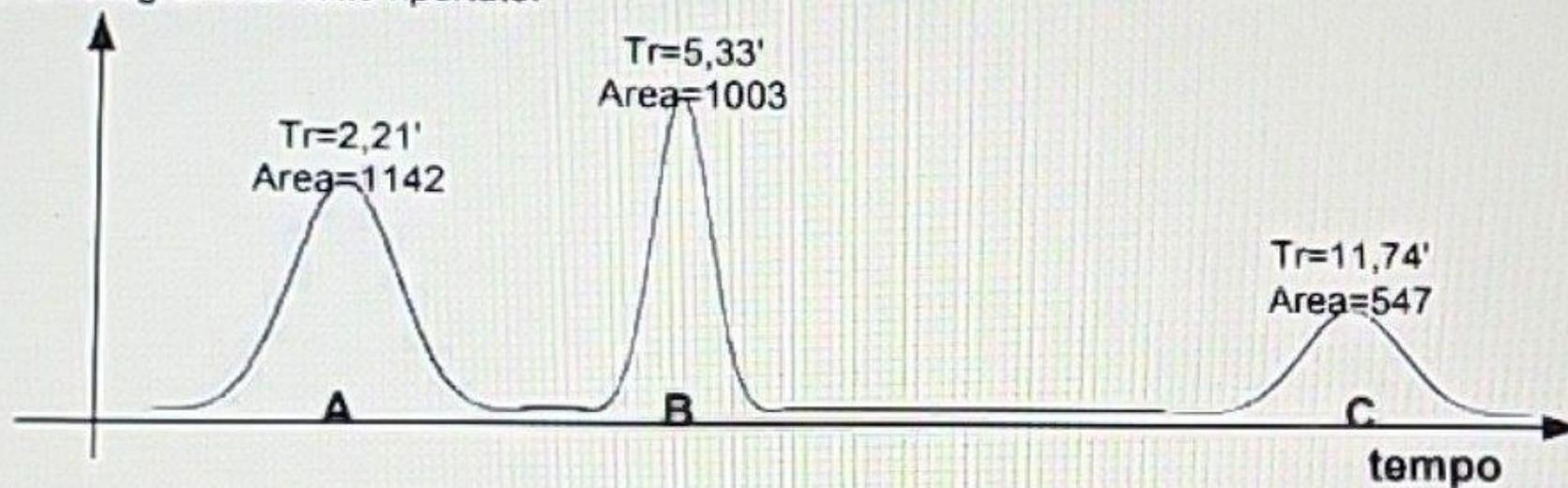
*Se la risposta del rivelatore è uguale per tutti i componenti e se questi sono rappresentati tutti nel cromatogramma da picchi ben distinti e risolti, si verifica quindi **la condizione che il rapporto tra area di picco e concentrazione del componente è uguale per tutti i picchi:***

$$\frac{S_A}{C_A} = \frac{S_B}{C_B} = \frac{S_C}{C_C} = \dots$$

Allora in questo caso la % **in massa** di ciascun componente *si ottiene dividendo l'area del rispettivo picco per la somma delle aree di tutti i picchi , rapportando il valore al 100*

Esempio 1 (analisi quantitativa per confronto diretto delle aree dei picchi)

Abbiamo iniettato in colonna una miscela di tre idrocarburi (A, B e C) ottenendo (rivelatore FID) il cromatogramma sotto riportato:



Dalla letteratura sappiamo che la risposta del rivelatore è tale che il rapporto tra aree e concentrazioni (%massa) è uguale per i tre idrocarburi.

$$\text{Area TOT} = 1142 + 1003 + 547 = 2692$$

$$\%A = \frac{1142}{2692} \cdot 100 = 42,4\%$$

$$\%B = \frac{1003}{2692} \cdot 100 = 37,3\%$$

$$\%C = \frac{547}{2692} \cdot 100 = 20,3\%$$

CAMPI DI APPLICAZIONE DELLA GC

- ANALISI ALIMENTI E AROMI
- ANALISI AMBIENTALI (IPA, PESTICIDI, ERBICIDI, BENZENE)
- ANALISI CHIMICHE E INDUSTRIALI (ALCOLI, IDROCARBURI ALOGENATI, SOLVENTI AROMATICI, FENOLI)
- ANALISI PETROLIFERE (CARBURANTE, COMPOSTI VOLATILI SOLFORATI, GAS DI RAFFINERIA)





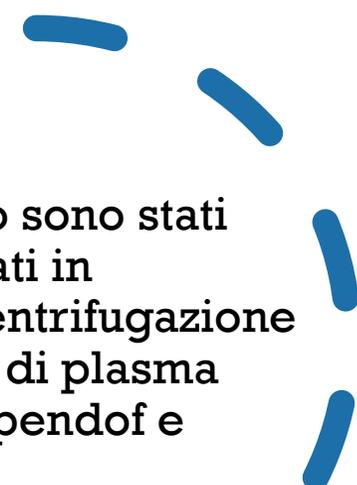
GASCROMATOGRAFIA IN TOSSICOLOGIA FORENSE

- Le analisi tossicologiche in ambito forense prevedono l'esame di matrici convenzionali (sangue/urina), o di matrici alternative (fluido orale, sudore).
- Per confermare e quantificare l'abuso di sostanze stupefacenti nelle matrici urina (amfetamine), cheratina (delta-9-THC) e sangue (sostanze d'abuso basiche), sono impiegati gli **Eureka Kit**.
- Questi sono **test di conferma di secondo livello e vanno obbligatoriamente analizzati Gascromatografia e Cromatografia liquida con abbinato un detector di massa**.



ARTICOLO SCIENTIFICO

- **"L'ANALISI METABOLOMICA GC X GC TOFMS IDENTIFICA LIVELLI ELEVATI DI ZUCCHERI PLASMATICI E ALCOLI DI ZUCCHERO NEI PAZIENTI DIABETICI MELLITI CON INSUFFICIENZA RENALE"**
- Il *diabete mellito* è una malattia cronica caratterizzata da elevati livelli di glucosio nel sangue, dovuti ad un'inefficace produzione o utilizzo di insulina
- Il DM è tra le prime 10 principali cause di mortalità negli adulti e la sua incidenza è in aumento a livello globale



[J Biol Chem.](#) 2022 ottobre; 298(10): 102445.

Publicato online il 31 agosto 2022. doi:

[10.1016/j.jbc.2022.102445](https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.102445)

ID PMC: PMC9531178 | PMID: [36055403](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36055403/)

L'analisi metabolomica GC × GC-TOFMS identifica livelli elevati di zuccheri plasmatici e alcoli di zucchero nei pazienti diabetici melliti con insufficienza renale

[Kassaporn Duangkumpha](#), ^{1,2} [Narumol Jariyasopit](#), ^{1,}

² [Kwanjeera Wanichthanarak](#), ^{1,2} [Esha Dhakal](#), ^{1,2}

[Pattipong Wisanpitayakorn](#), ^{1,2} [Sansanee Thotsiri](#), ³

[Yongyut Sirivatanauksorn](#), ² [Chagriya Kitiyakara](#), ^{4,5}

[Nuankanya Sathirapongsa suti](#), ^{5,6} e

[Sakda Khoomrung](#), ^{1,2,7,*}

- **METODI:** campioni di sangue fresco sono stati raccolti da ciascun soggetto e conservati in etilendiamminotetraacetico. Dopo la centrifugazione a 3500 giri/min per 10 min, 100 microL di plasma sono stati aliquotati in una provetta, Eppendof e conservati a -80° dall'analisi

- **STUDIO CASO-CONTROLLO TRASVERSALE**

- **SOGGETTI:** 3 GRUPPI DA 20 PERSONE

- **CON** (volontari sani di sesso M e sesso F)

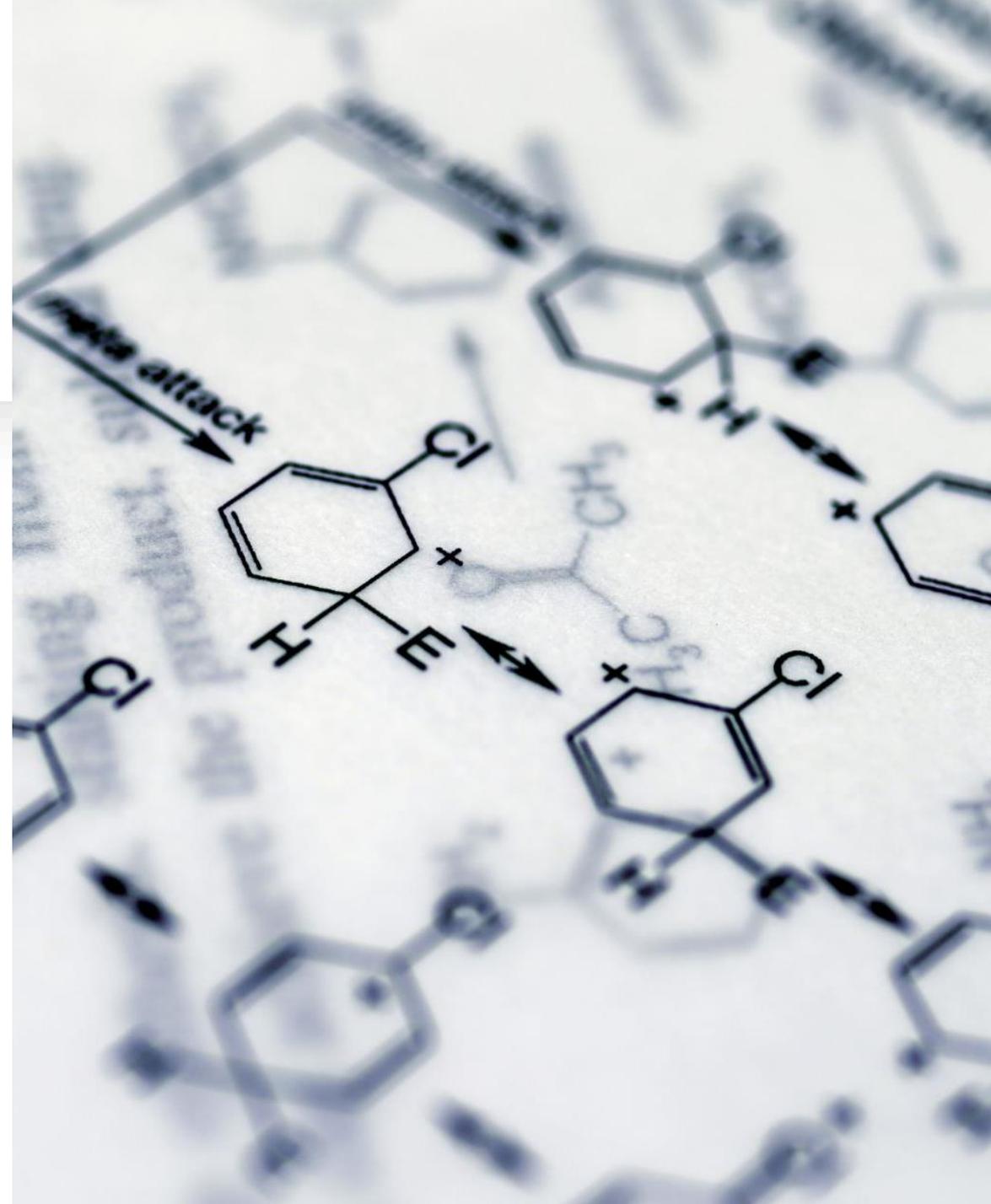
- **DM** (diabete con funzionalità renale normale)

- **DM CON KF** (diabete con insufficienza renale)

- **ANALISI CG -TOFMS:** i campioni derivati sono stati analizzati tramite GC x GC-TOFMS. Un microlitro di ciascun campione è stato iniettato in modalità *split* a 250°. Come gas di trasporto è stato utilizzato l'elio; la ionizzazione elettronica è stata eseguita a 70eV., con una temperatura della sorgente ionica a 250°. I dati sperimentali sono stati raccolti in modalità scansione. Il ritardo del solvente è stato impostato su 500s

RISULTATI:

- Rivelazione di 35 metaboliti significativi nel gruppo DM con KF, rispetto ai gruppi CON e DM,
- Si è determinato che 17 dei 35 (14/17 verificati con standard di riferimento) metaboliti significativi identificati da entrambe le analisi erano dei metaboliti dei gruppi zucchero e zucchero-alcol, con concentrazioni significativamente più elevate nel gruppo DM con KF, rispetto al gruppo CON e DM.
- L'analisi di arricchimento di questi 14 metaboliti ha rivelato che le alterazioni nel metabolismo del galattosio sono correlate al DM con KF.
- Nel complesso l'applicazione di GC x GC-TOFMS ha identificato metaboliti chiave in matrici plasmatiche complesse





- **ELETTROFORESI**

- Tecnica di separazione, basata sulla diversa velocità di migrazione delle specie cariche in un campo elettrico.

- **CAMPO DI APPLICAZIONE:** usata in campo clinico e biochimico per la separazione di macromolecole come proteine, enzimi, anticorpi e acidi nucleici.

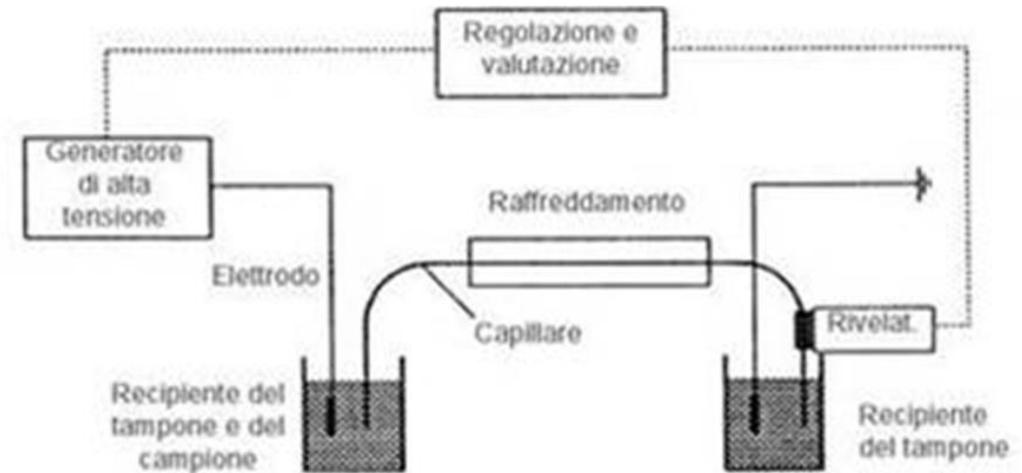
- **COME SI ESEGUE?** Si inietta una banda di campione in una soluzione tampone, contenuta in un tubo stretto oppure in un mezzo di supporto poroso piatto.

- **TIPI DI ELETTROFORESI:**

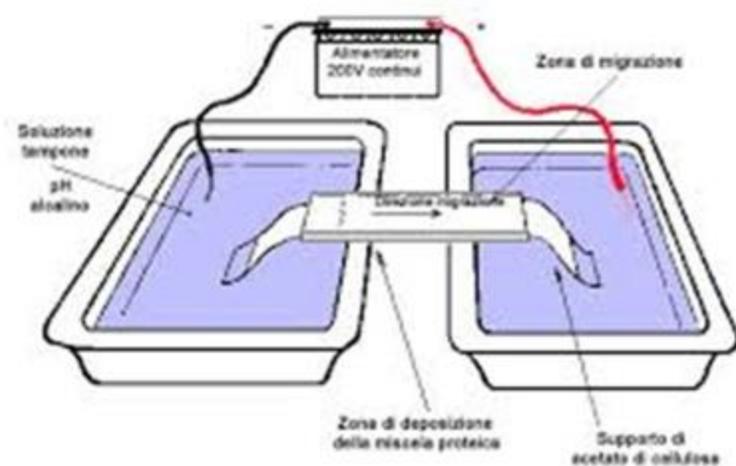
- su piastra
- capillare

ELETTROFORESI CAPILLARE

- Efficiente metodo analitico che produce separazioni ad alta velocità su campioni straordinariamente piccoli



SCHEMA ALLESTIMENTO SEMPLIFICATO ELETTROFORESI



- **VELOCITA' DI MIGRAZIONE NELL'ELETTROFORESI CAPILLARE**

- La velocità di migrazione di uno ione (v) dipende dalla forza del campo elettrico.

- $v = \mu_e \times \frac{V}{L}$

STRUMENTAZIONE

Tipologia di strumentazione semplice. Si usa un capillare di silice, riempito di tampone che si estende tra due serbatoi, che reggono anche gli elettrodi di platino. Per la protezione e la sicurezza dell'utente che esegue le analisi, i compartimenti elettroforetici hanno arresti di sicurezza collegati tra loro.

- **COME SI INTRODUCE IL CAMPIONE?**
-
- I metodi più usati sono due:
 - **iniezione elettrocinetica** estremità ed elettrodo vengono messi in una coppa con il campione e il campione entra nel capillare per migrazione ionica e flusso elettrosmotico.
 - **iniezione a pressione** in questo caso il campione entra nel capillare per differenza di pressione.



- **METODI DI RIVELAZIONE**
- I rivelatori più usati in **elettroforesi capillare** sono:
 - rivelatori di *fluorescenza*
 - rivelatori di *assorbimento*
- La rivelazione viene fatta su colonna.



- **RIVELAZIONE SPETTROSCOPICA DI MASSA**

- La velocità di flusso che parte dai capillari elettroforetici rende possibile inviare direttamente i componenti separati alla sorgente di ionizzazione di uno spettrometro di massa.

-



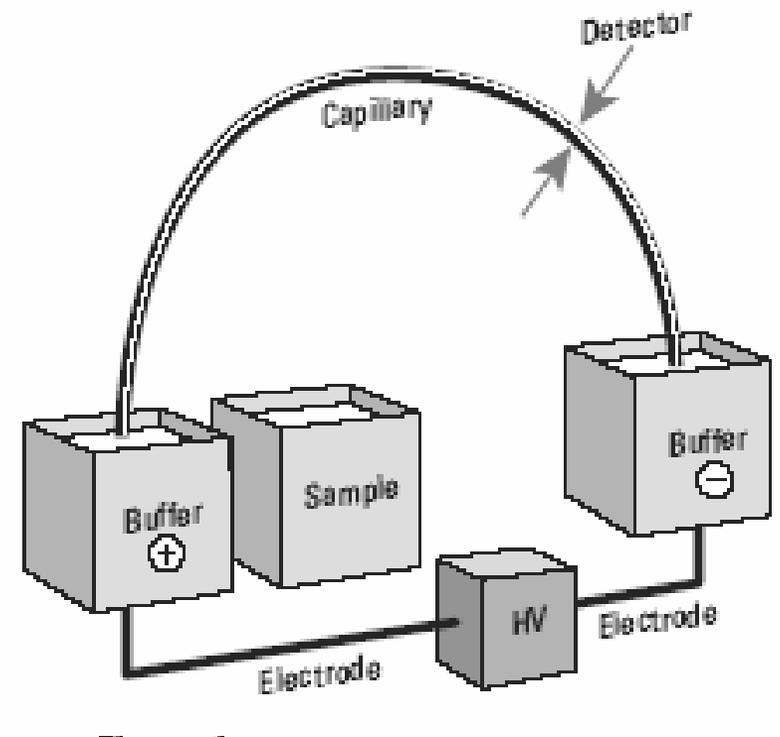
Confronto tra due sistemi per elettroforesi capillare e in gel d'agarosio per la ricerca e caratterizzazione di componenti monoclonali nel siero.



Dipartimento di Scienze Cliniche, Università degli Studi, Milano

Applicazione della elettroforesi capillare:

- Le separazioni elettroforetiche possono essere eseguite secondo parecchi metodi diversi, tra cui:
 - Elettroforesi capillare di zona
 - Elettroforesi capillare su gel
 - L'isotacoforesi capillare



Elettroforesi capillare di zona (CZE)



Nell'elettroforesi capillare di zona, le molecole di diverse dimensioni migrano a velocità diverse attraverso il capillare a causa della loro interazione con il tampone e del loro rapporto carica/massa.



La composizione del tampone è costante



Il campo elettrico determina la migrazione di ciascuna delle componenti ioniche della miscela



La separazione in zone possono essere completamente risolte o parzialmente sovrapposte



Le molecole più piccole possono muoversi più velocemente attraverso il tampone, mentre le molecole più grandi si muovono più lentamente.



Di conseguenza, le molecole vengono separate in base alle loro dimensioni e formano bande o picchi distinti lungo il capillare, consentendo l'analisi e la caratterizzazione delle molecole presenti nel campione.

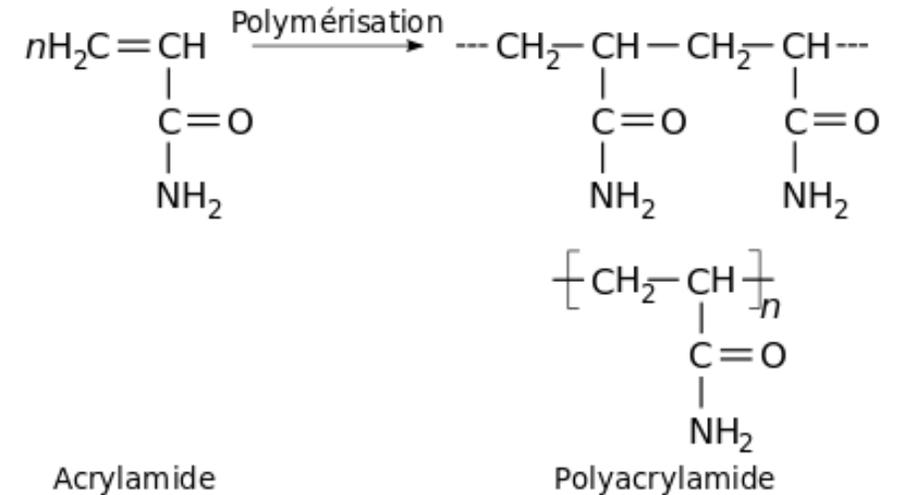
Separazione di specie molecolari

- Mediante la CZE sono stati separati e analizzati numerosi erbicidi sintetici, pesticidi e prodotti farmaceutici
- Proteine, amminoacidi e carboidrati sono tutti stati separati in tempi minimi grazie alla CZE.
- Nel caso di carboidrati neutri, le separazioni sono precedute dalla formazione di complessi borati carichi negativamente.

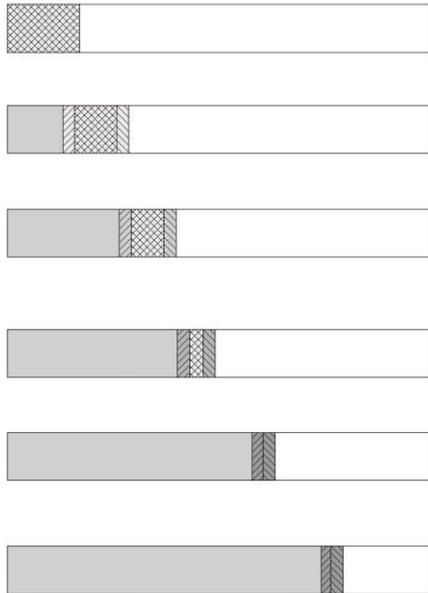


Elettroforesi capillare su gel (CGE)

- Viene in genere eseguita in una matrice polimerica di gel poroso con una miscela tampone che riempie i pori del gel
- Solitamente il gel utilizzato è un polimero di poliacrilammide
- Si forma mediante la polimerizzazione dell'acrilammide in presenza di un agente legante
- La dimensione dei pori del polimero dipende dal rapporto tra il monomero e l'agente legante (più agente legante = pori più piccoli)
- Altri gel: agarosio, metilcellulosa, ossido di polietilene, il destrano etc.



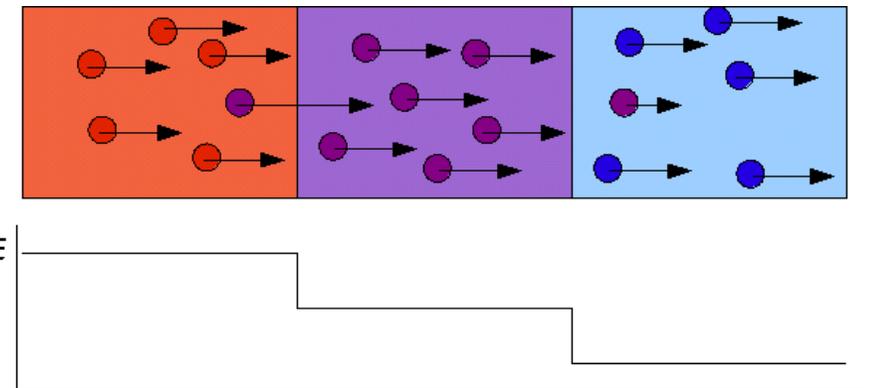
Isotacoforesi



Nell'isotacoforesi capillare tutte le bande dell'analita migrano in definitiva alla stessa velocità. In una separazione per isotacoforesi, il campione viene iniettato tra due tamponi: uno di testa, contenente gli ioni con mobilità maggiore di qualunque ione dell'analita, e uno di coda, a mobilità più bassa.

Banda grigia= tampone di coda
Banda bianca=tampone di testa

Dato che su ogni banda agirà un campo elettrico con intensità differente, uno ione che si sposta in una banda adiacente alla sua banda di origine, tenderà a ritornare nella sua posizione iniziale.

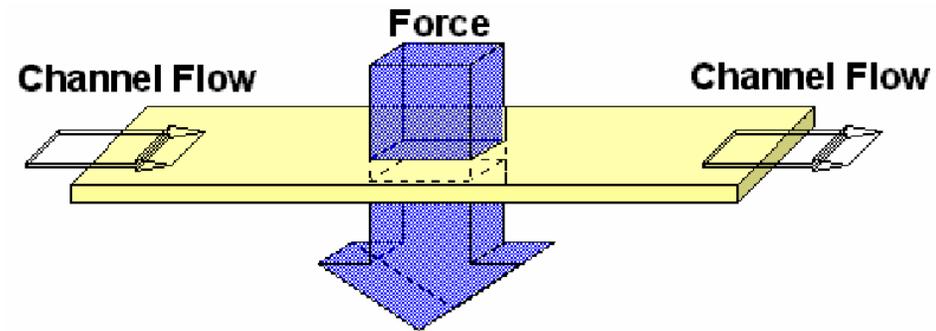


Frazionamento in campo di flusso (FFF)



La tecnica di Frazionamento in Campo-Flusso (Field-Flow Fractionation, FFF) è stata sviluppata nella seconda metà degli anni '60 da Calvin Giddings, uno dei primi ricercatori ad essersi occupato anche di cromatografia liquida.

Il principio fondamentale della separazione FFF è l'applicazione di una forza normale (campo) alla direzione del flusso degli analiti che si intende separare, a sua volta confinato all'interno di un canale capillare a sezione rettangolare, in cui non è presente una fase stazionaria:



Tecniche frazionamento in campo di flusso

Le tecniche di frazionamento in campo-flusso si distinguono in base alla natura del campo applicato dall'esterno.

Le più diffuse sono:

FFF per sedimentazione

FFF elettrico

FFF termico

FFF di flusso

Sviluppo e applicazione per separare e caratterizzare sospensioni di macromolecole di interesse biologico, ambientale e alimentare.

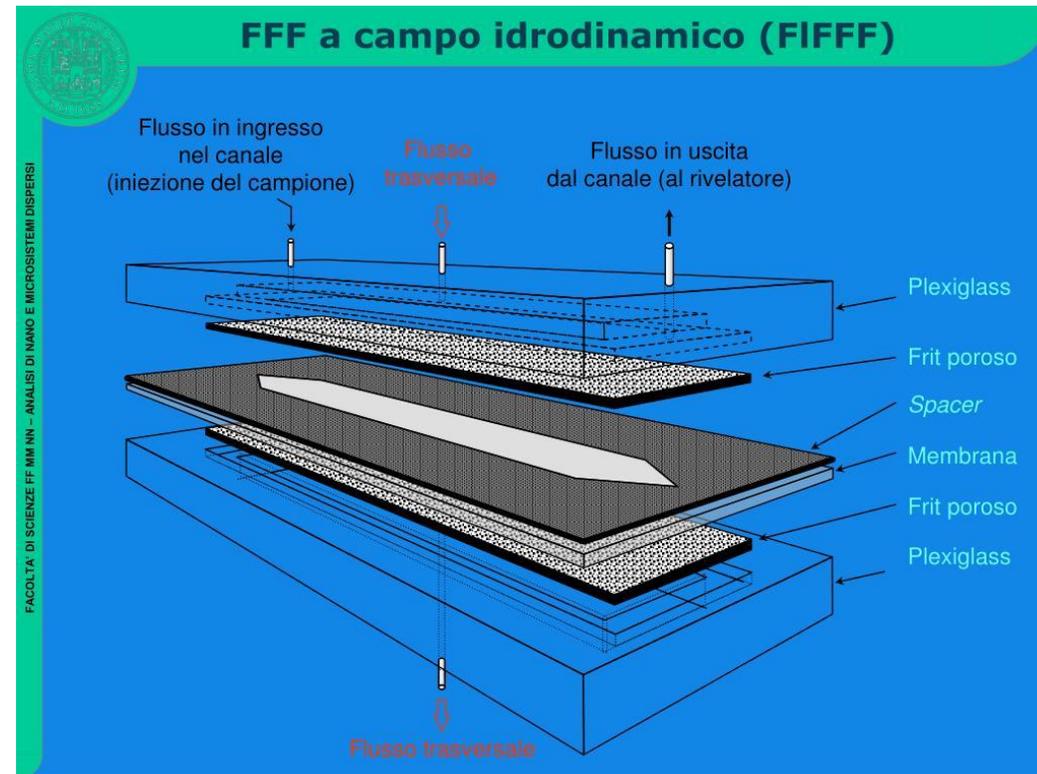
Gli analiti separabili hanno la massa molecolare superiore a quella consentita per le tecniche cromatografiche perché nel frazionamento in campo di flusso gli analiti devono avere dimensioni tali da risentire di campi come quello gravitazionale.

VANTAGGI

- Assenza fase stazionaria o materiale impaccante
- Assenza interazioni tra i costituenti del campione e fase stazionaria o materiale impaccante
- Profili geometrici e di flusso sono ben caratterizzati
- Utilizzando la FFF possiamo fare previsioni teoriche precise sulla ritenzione e sull'altezza del piatto
- Complementare alla cromatografia

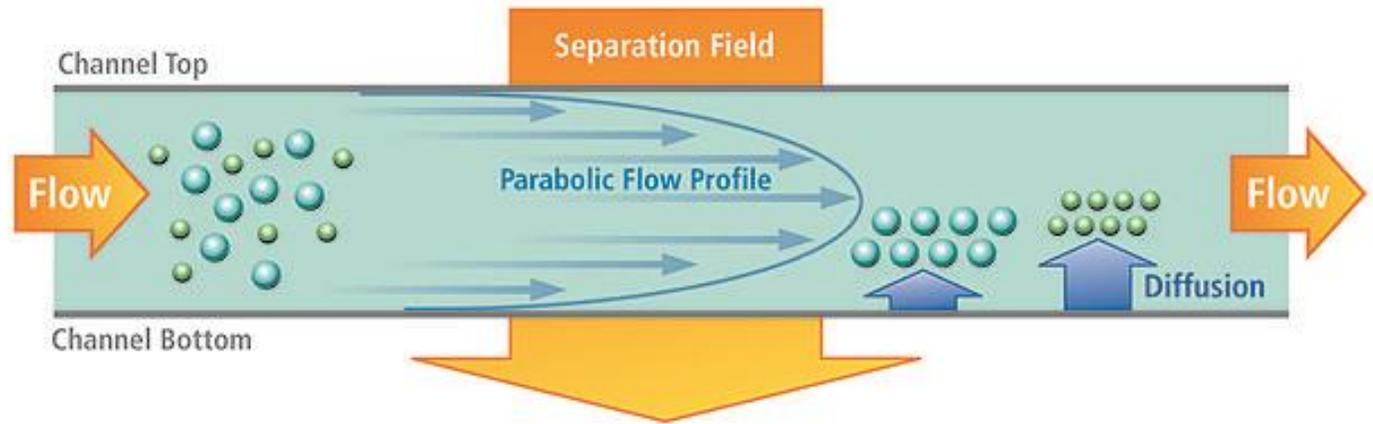
Meccanismo di separazione

- Sottile canale di flusso interposto tra due pareti distanziate.
- Perpendicolarmente alla direzione del flusso viene applicato un campo elettrico, termico o centrifugo.
- In presenza del campo, le componenti del flusso migrano verso la parete di accumolo.
- Lo spessore dello strato dei componenti dipende dal coefficiente di diffusione D e dalla velocità U indotta dal campo.



Meccanismo di separazione

- Una volta che le componenti hanno raggiunto il profilo di stato stazionario vicino alla parete di accumulo, si attiva il flusso del canale laminare e produce un profilo parabolico.



- I componenti separati fluiscono attraverso un rivelatore ad assorbimento Uv-visibile, ad indice di rifrazione oppure un rivelatore a fluorescenza.
- I risultati vengono evidenziati in un diagramma in funzione del tempo che prende il nome di Frattogramma.



Metodi del frazionamento in campo di flusso

- **FFF per sedimentazione**

Il canale è avvolto a spirale e fatto per essere inserito all'interno di un cesto di centrifuga.

I componenti con massa e densità maggiori vengono spinti verso la parete di accumulo attraverso la forza di sedimentazione ed eluiscono per ultimi.

- **FFF elettrico**

Si applica un campo elettrico perpendicolare alla forza di flusso.

La ritenzione e la separazione avvengono in base alla carica elettrica.

Le particelle con carica minore vengono spinte in modo più efficace verso la parete di accumulo.

- **FFF termico**

Si applica un campo termico che forma un gradiente termico lungo il canale.

La differenza di temperatura provoca una diffusione termica in cui la velocità di movimento è correlata al coefficiente di diffusione termico della specie.



GRAZIE PER L'ATTENZIONE