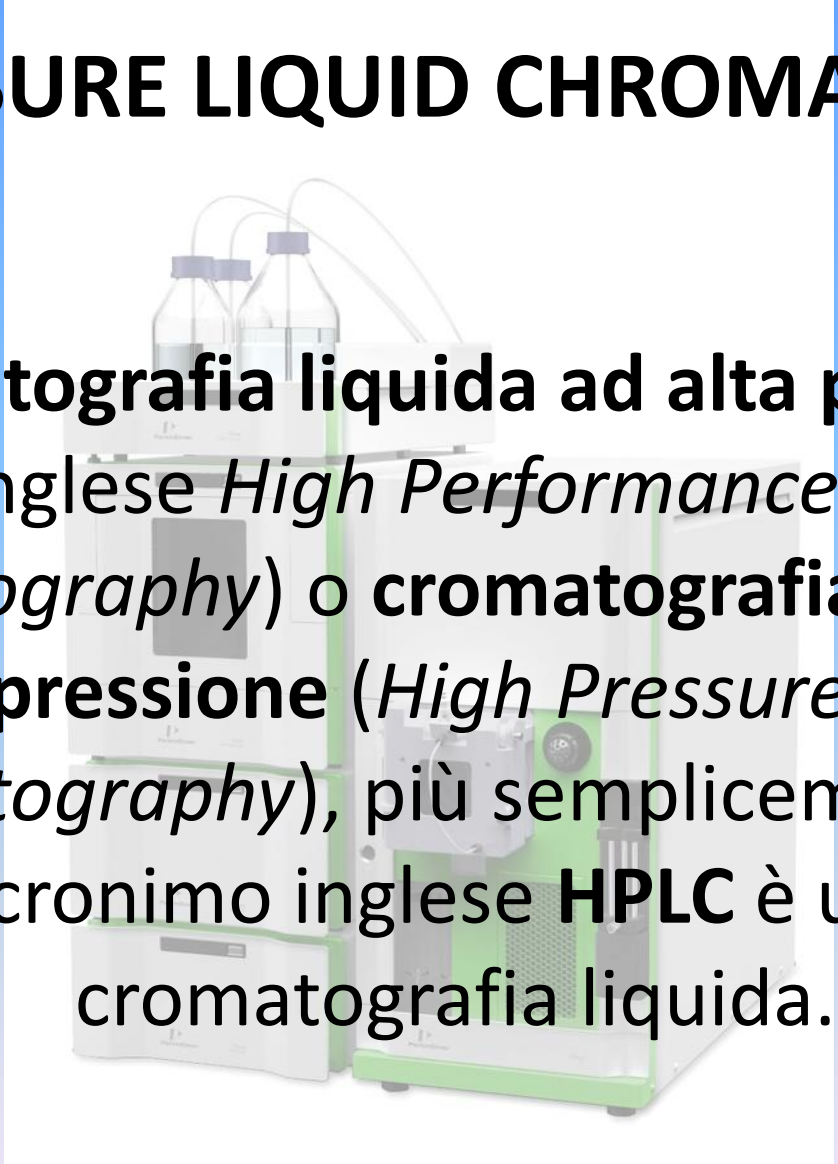
High Performance Liquid Chromatography

IS Fermi Mantova
Progetto Scuola 21
AS 2012-2013

HPLC
-A POWERFUL SEPARATION METHOD-

A cura di Alessandro, Federico e Gennaro
5ACH

HIGH PRESSURE LIQUID CHROMATOGRAPHY



La **cromatografia liquida ad alta prestazione** (in inglese *High Performance Liquid Chromatography*) o **cromatografia liquida ad alta pressione** (*High Pressure Liquid Chromatography*), più semplicemente nota con l'acronimo inglese **HPLC** è un tipo di cromatografia liquida.

PRINCIPIO DEL METODO

Si tratta di una tecnica cromatografica che permette di separare due o più composti presenti in un solvente sfruttando l'equilibrio di affinità tra una "fase stazionaria" posta all'interno della colonna cromatografica e una "fase mobile" che fluisce attraverso essa.

Una sostanza più affine alla fase stazionaria rispetto alla fase mobile impiega un tempo maggiore a percorrere la colonna cromatografica (tempo di ritenzione), rispetto ad una sostanza con bassa affinità per la fase stazionaria ed alta per la fase mobile.

I CONCETTI FONDAMENTALI

- FASE STAZIONARIA
- FASE MOBILE
- TEMPO DI RITENZIONE
- IL CAMPIONE

FASE STAZIONARIA

La fase stazionaria è un liquido supportato o chimicamente legato su solido all'interno di una colonna di acciaio o vetro speciale nella quale va a legarsi il soluto.

Quest' ultima è impaccata in colonne chiuse, con materiali di granulometria molto fine (5-10 µm) e controllata: in tal modo viene aumentata la superficie di contatto fra fase mobile e fase stazionaria e l'impaccamento diviene più omogeneo.

Questa fase è più polare della fase mobile,quindi le sostanze più polari saranno più trattenute e usciranno dopo dalla colonna, TR>

FASE MOBILE

Le fasi mobili (o eluenti) in HPLC sono solventi puri o miscele di due o più solventi che con il campione passano attraverso la colonna spinti da grandi pressioni.

Proprietà: Elevata purezza, basso costo, trasparenza UV, non corrosive, bassa viscosità, bassa tossicità, non infiammabili, buoni solventi per il campione.

Ogni eluente (o miscela)presenta **forza** e **selettività specifiche, che dipendono dalla polarità dei solventi e** dipende dal tipo di interazioni intermolecolari che li interessano: momento dipolare, dipolo indotto, legame ad H, etc.

TEMPO DI RITENZIONE

E’ il tempo necessario perchè una certa sostanza attraversi la colonna e sia rivelata dal rivelatore.

- ✓ Dipende dal grado di affinità che la sostanza stessa ha nei riguardi della fase stazionaria (espressa dai coefficienti di adsorbimento, ripartizione, di distribuzione in genere)
- ✓ Il differente tempo di ritenzione caratterizza e contraddistingue per ogni analisi i vari composti chimici presenti nel campione.

PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

Una **cosa fondamentale** di questa tecnica analitica è la **preparazione del campione** che si va ad introdurre nella macchina, in modo tale che non ci siano malfunzionamenti o risultati errati.

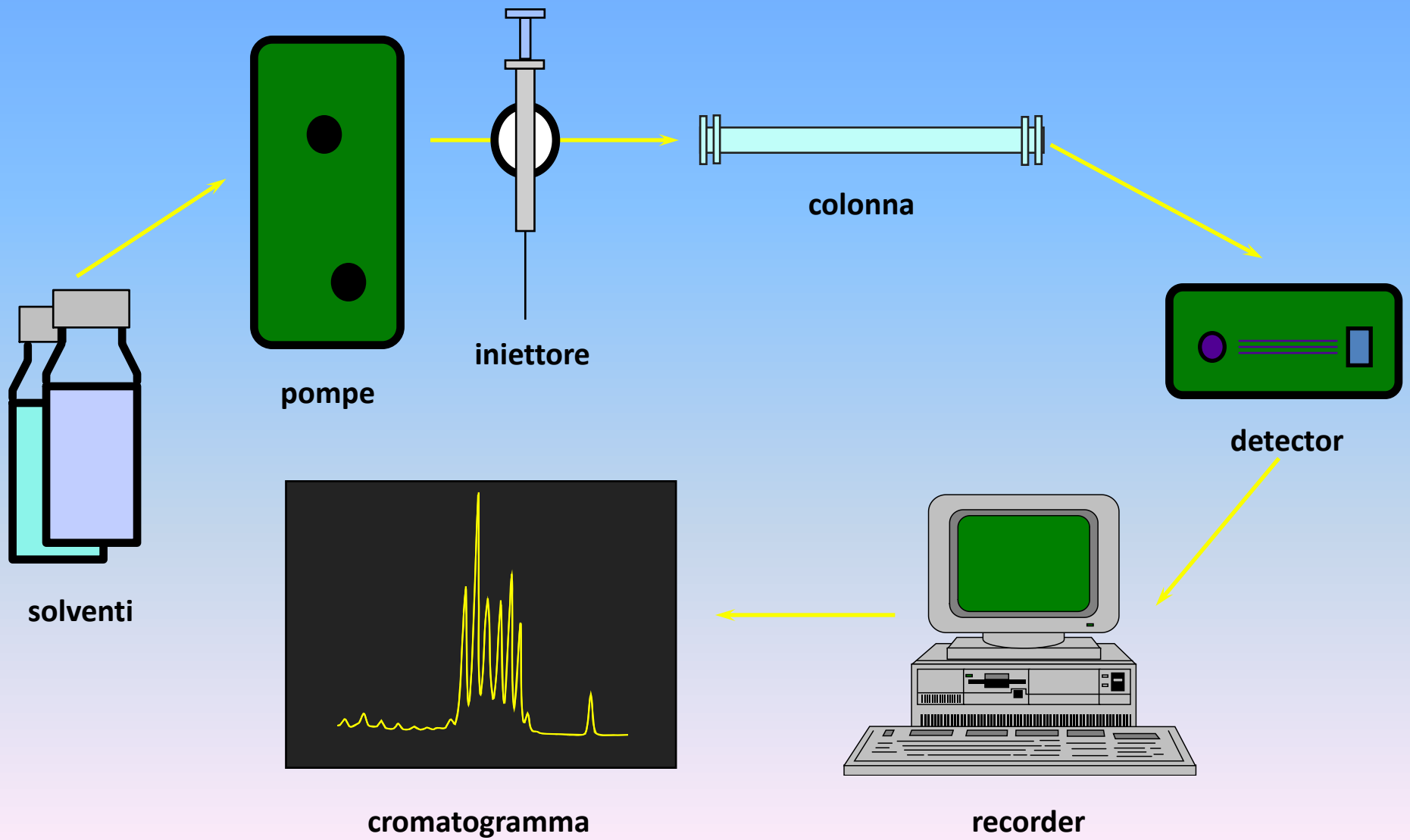
Questa procedura varia a seconda che si parta da una **matrice solida o da un liquido.**

- ✓ Matrice solida: si provvede a omogeneizzare la matrice e successivamente a estrarne il contenuto con appositi solventi che successivamente vengono filtrati e messi in vial.
- ✓ Matrice liquida: si omogenizza il campione, nel caso fosse troppo concentrato lo si diluisce, si filtra e si mette in vial.

FILTRI

Costituiti da uno strato di materiale inerte, servono ad impedire (tramite filtrazione) che granelli di materiali di qualunque tipo entrino all'interno della colonna. Vengono utilizzati in fase di preparazione del campioni o direttamente nel sistema.

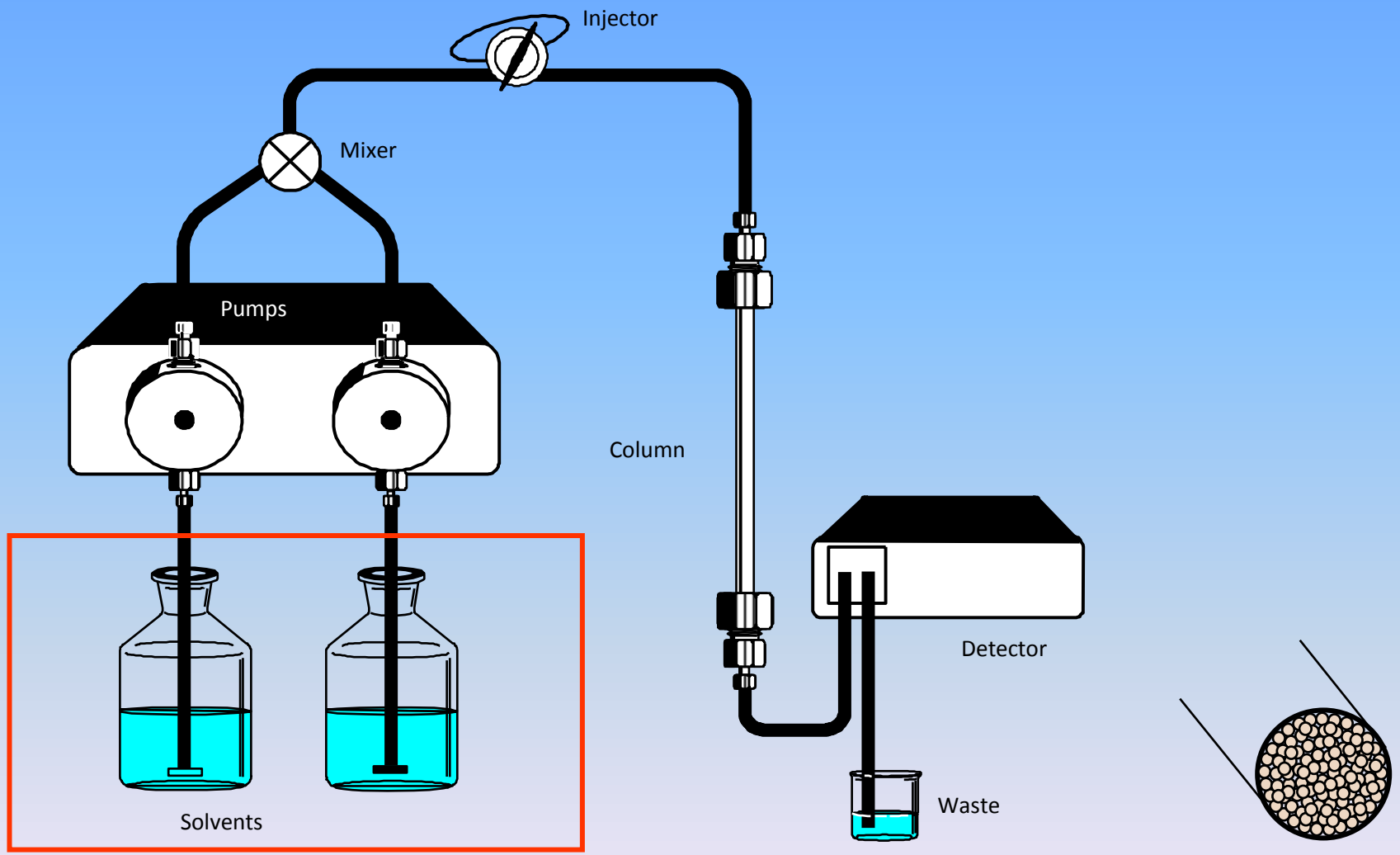
SCHEMA A BLOCCHI DEL SISTEMA



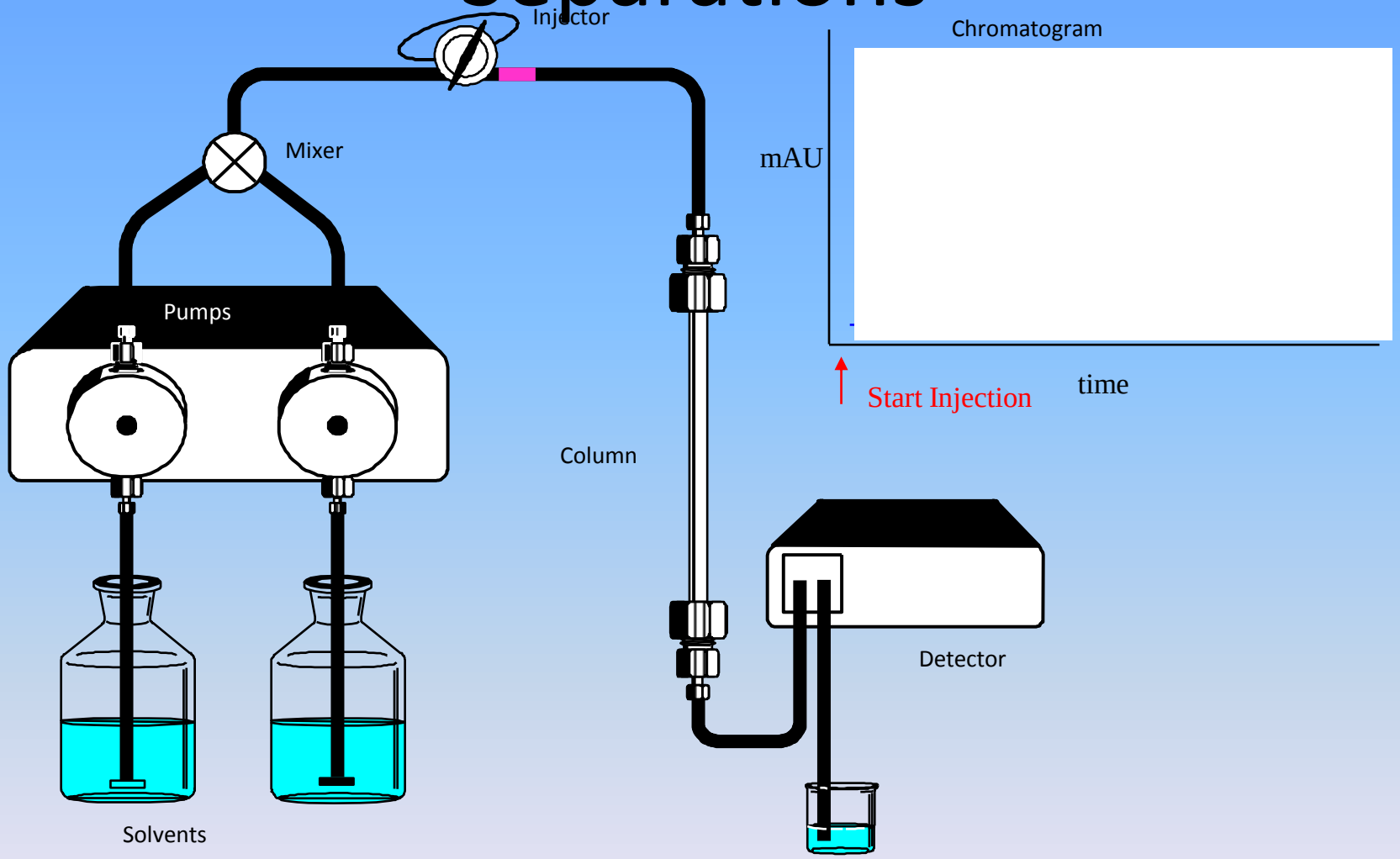
Quelli appena visti sono gli schemi a blocchi del processo.

Ora invece scorrendo velocemente le prossime slide avremo un’ immagine dinamica del processo di analisi per comprenderla a fondo!

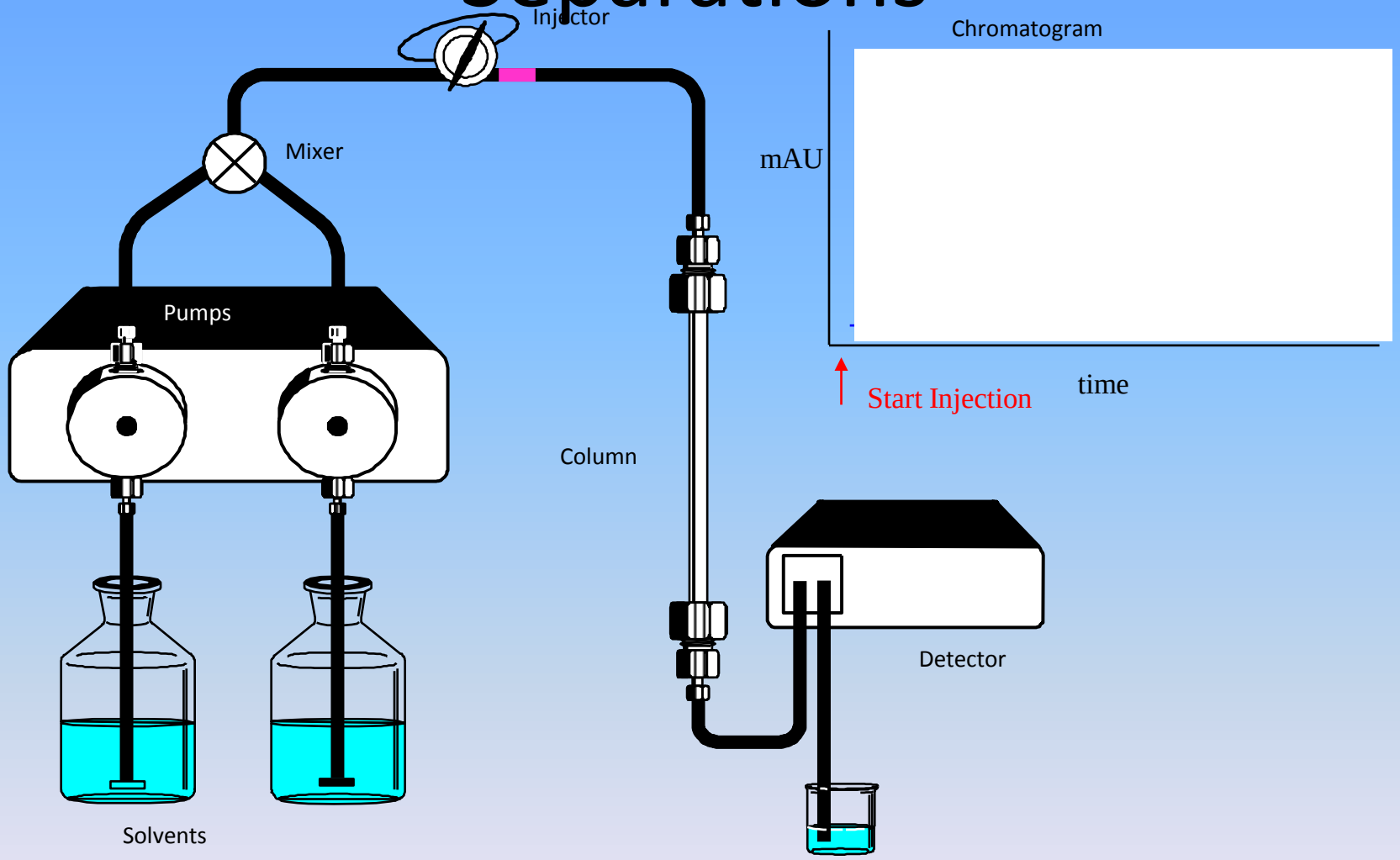
Separations



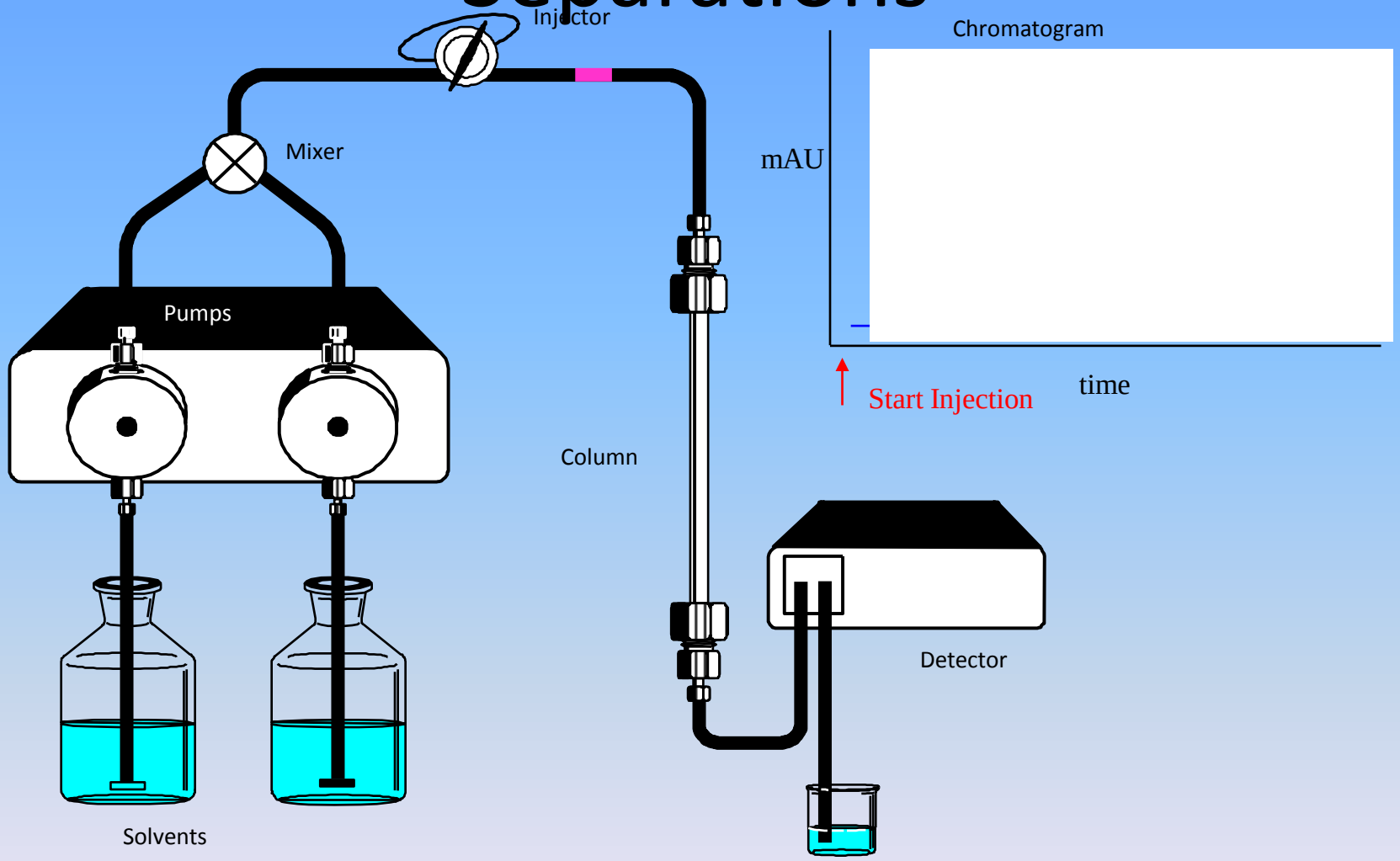
Separations



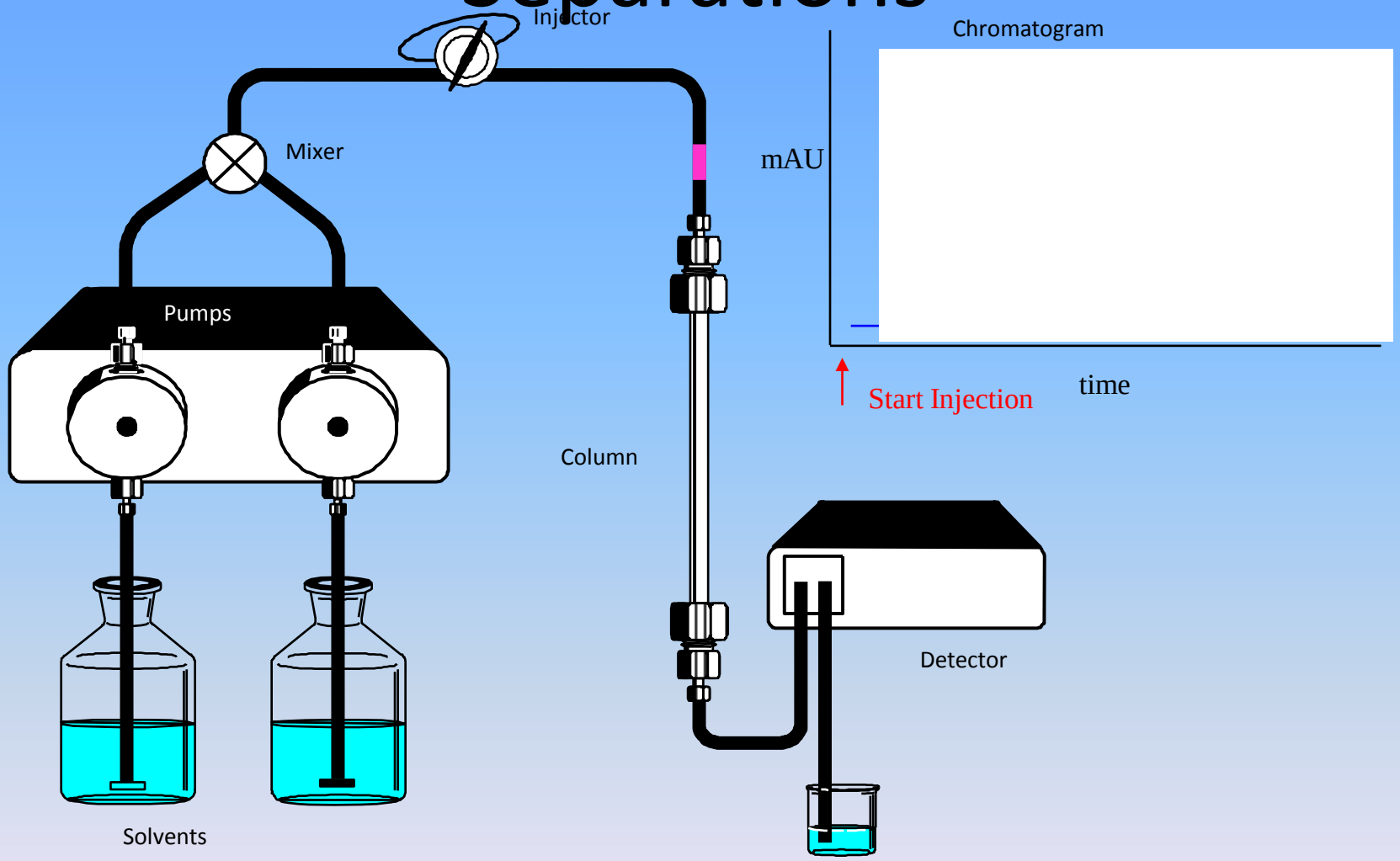
Separations



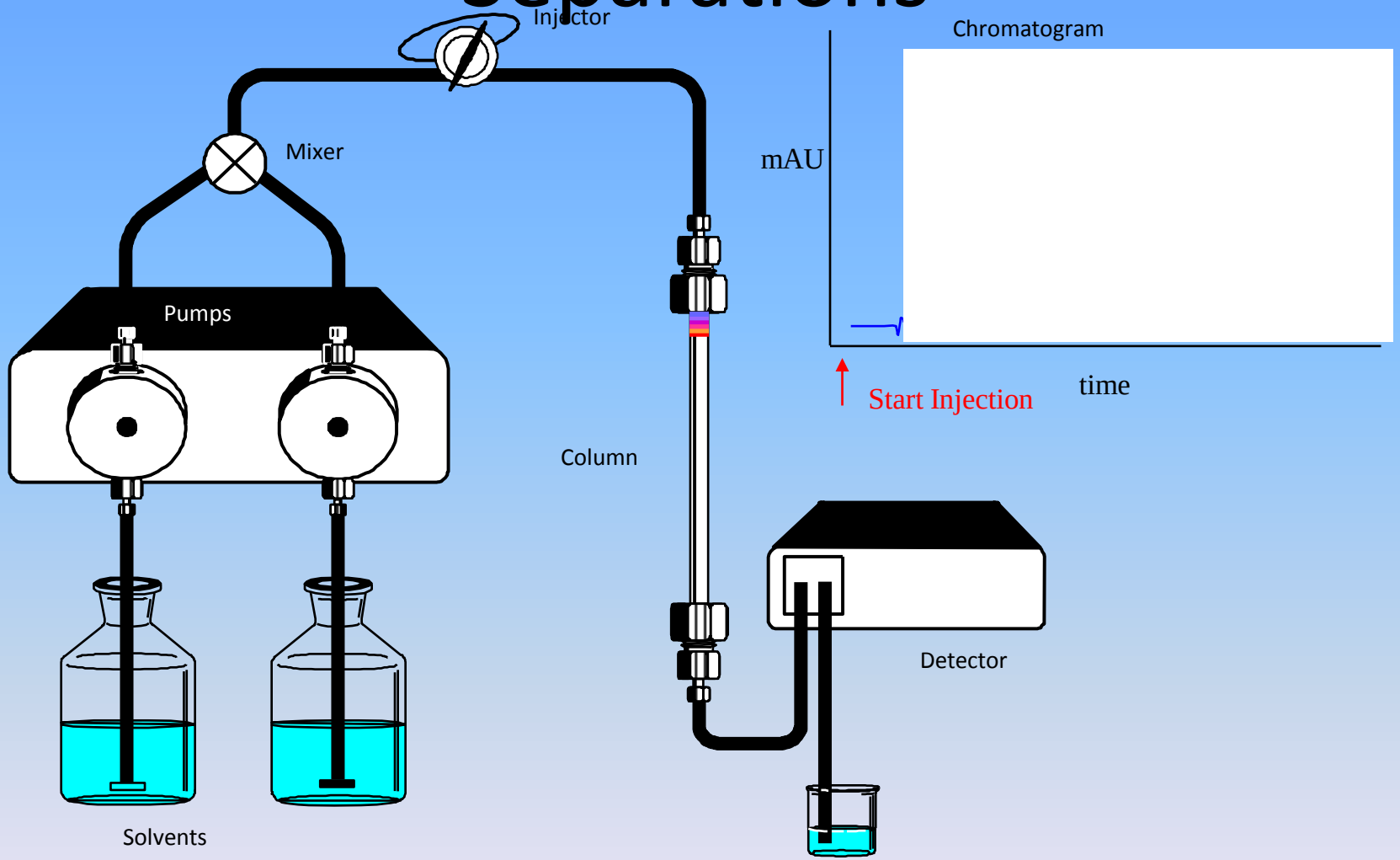
Separations



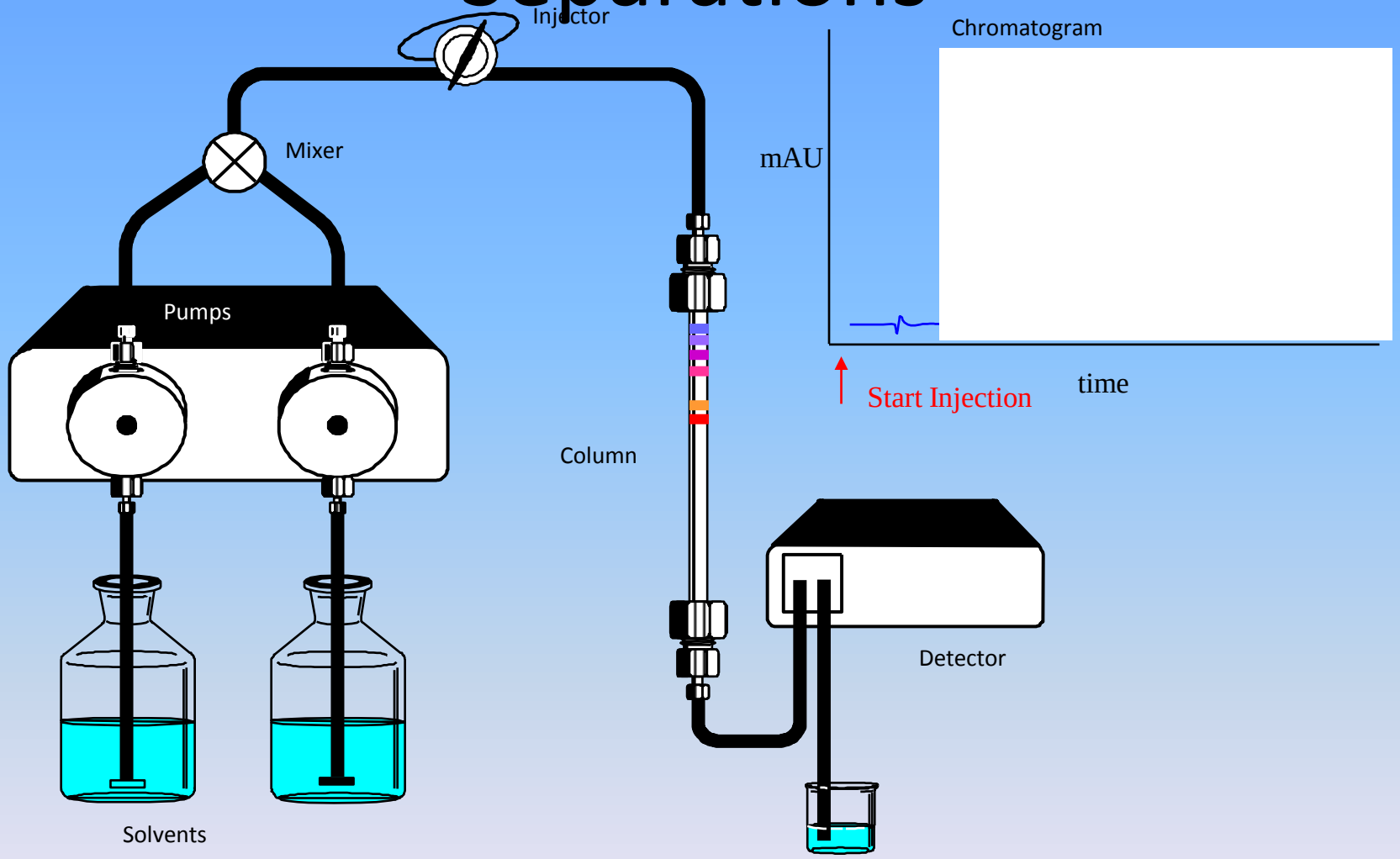
Separations



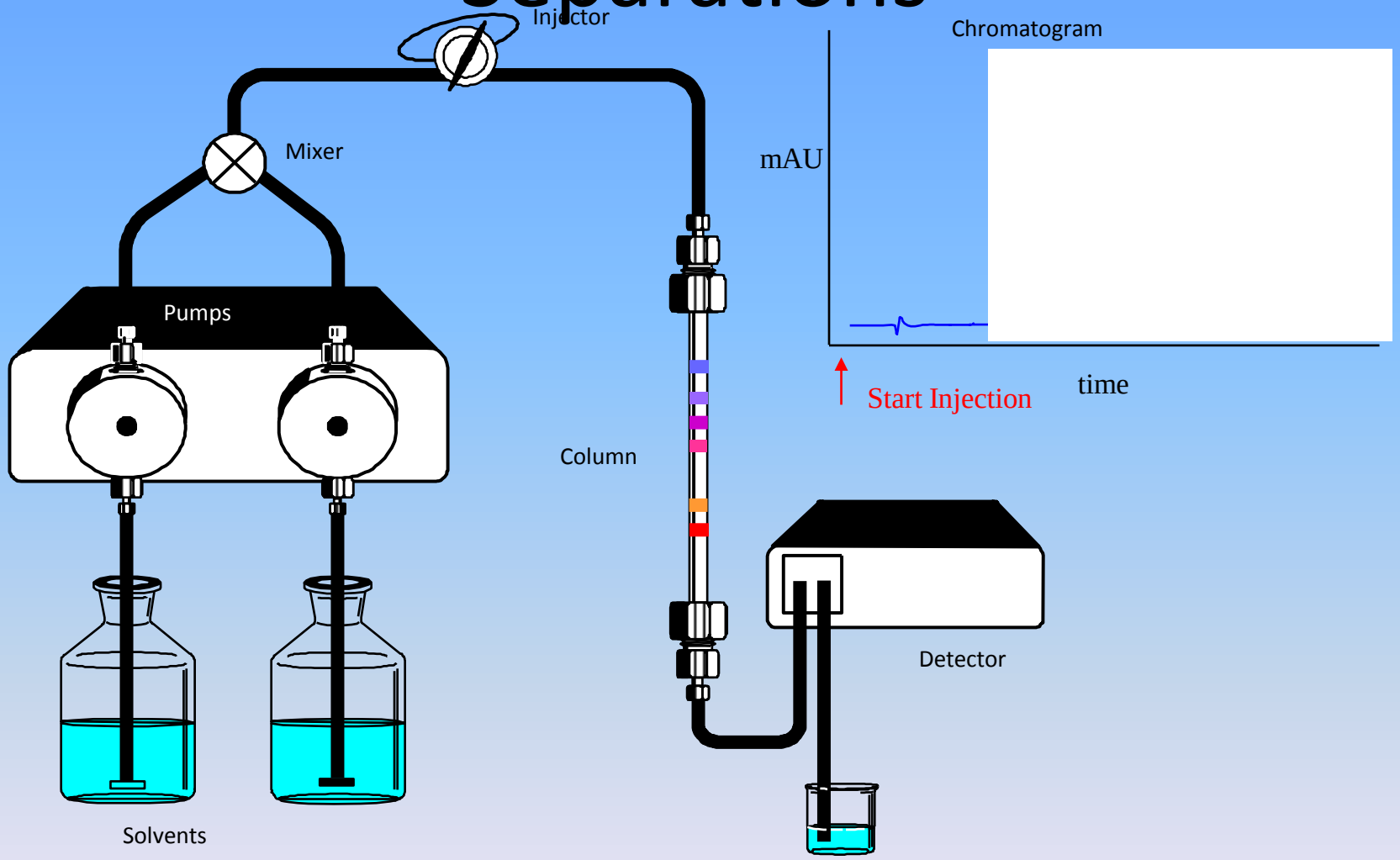
Separations



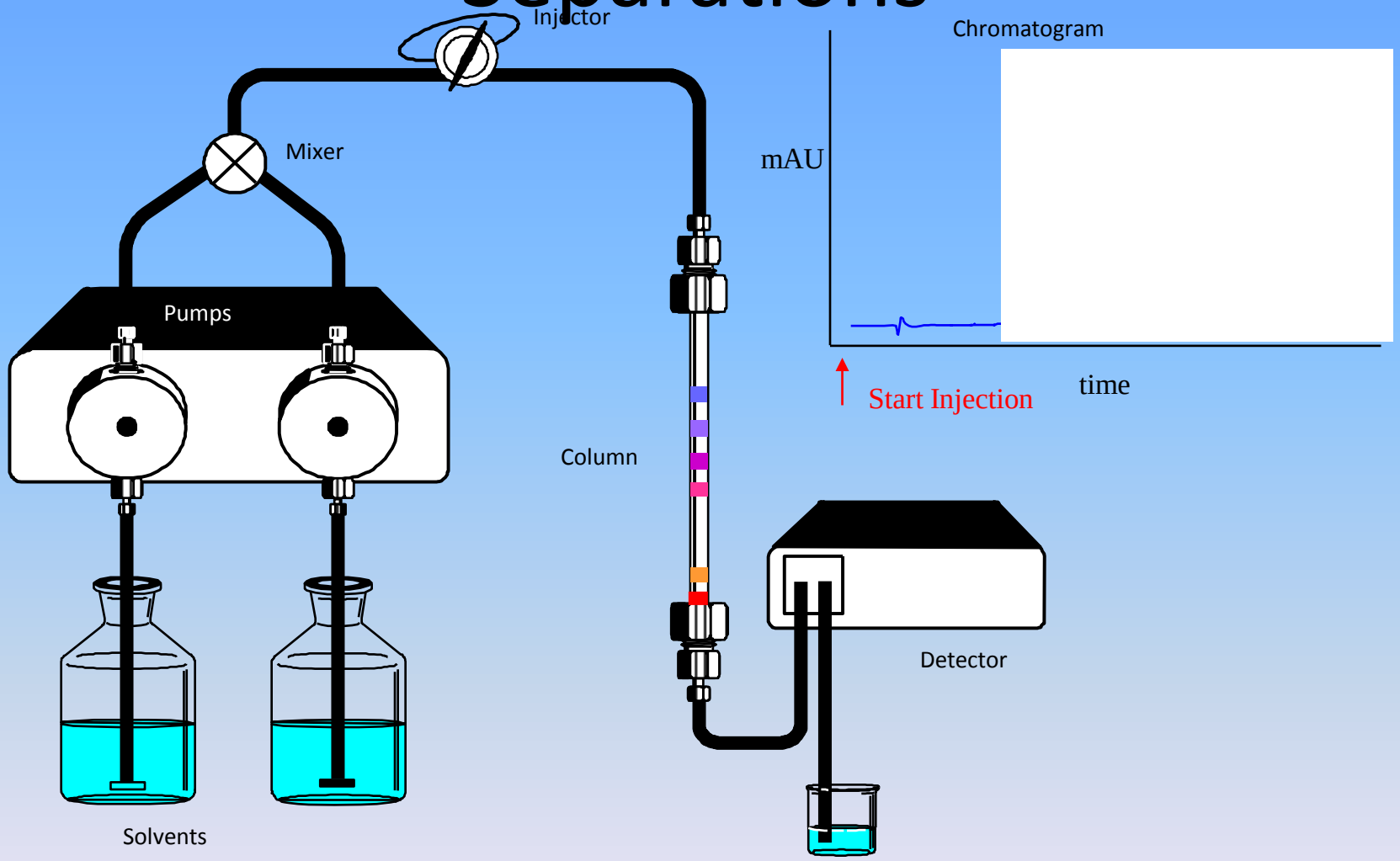
Separations



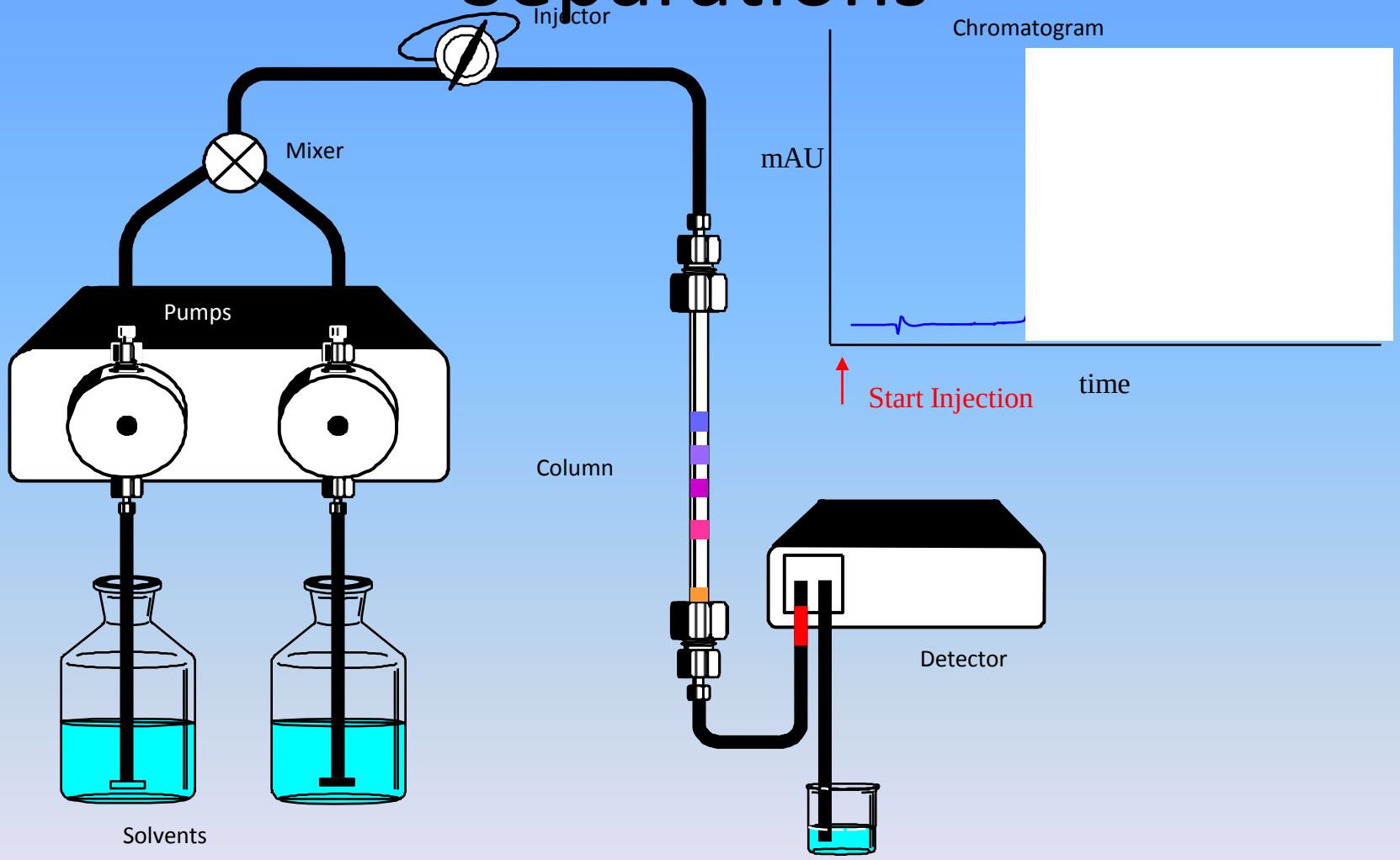
Separations



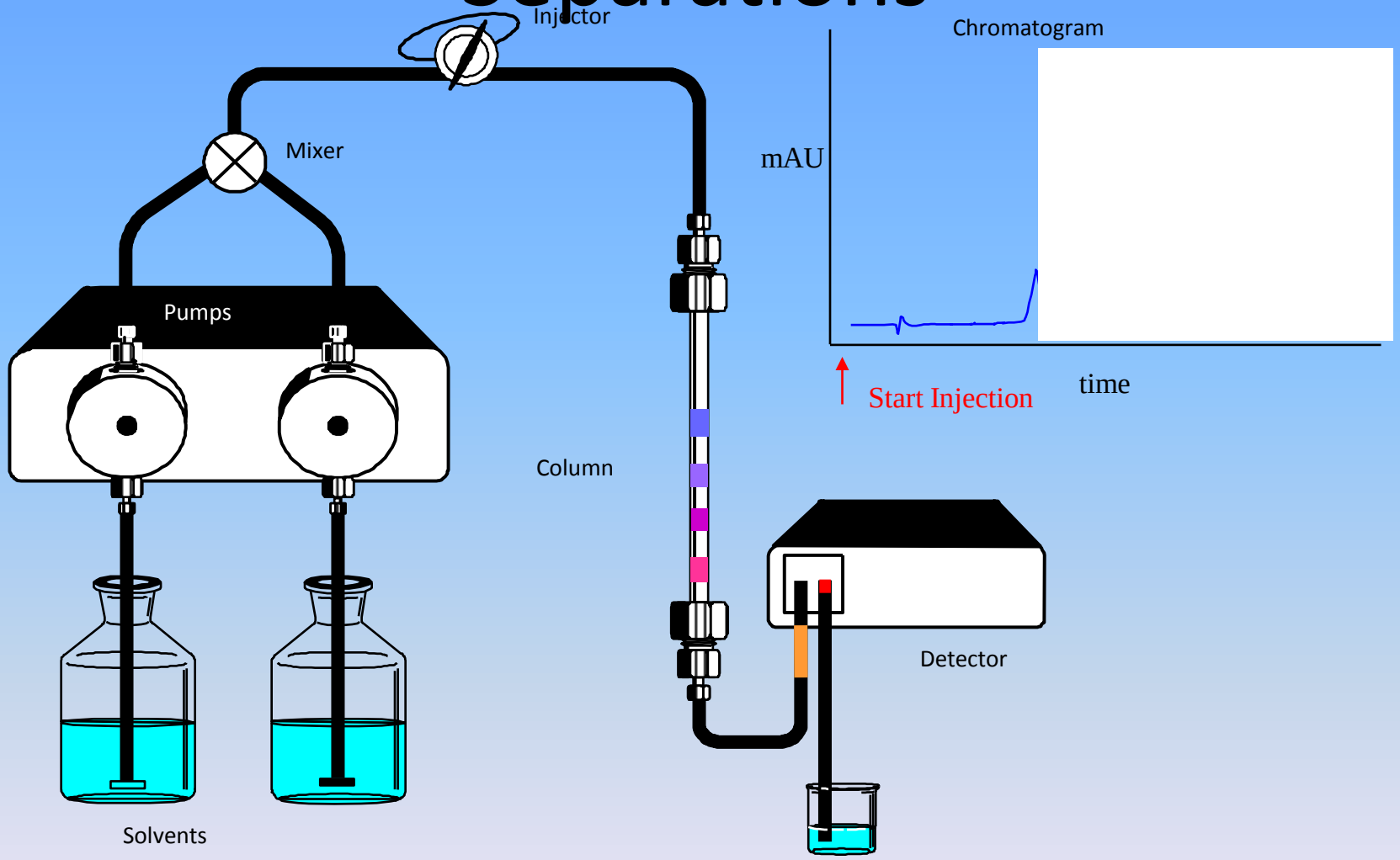
Separations



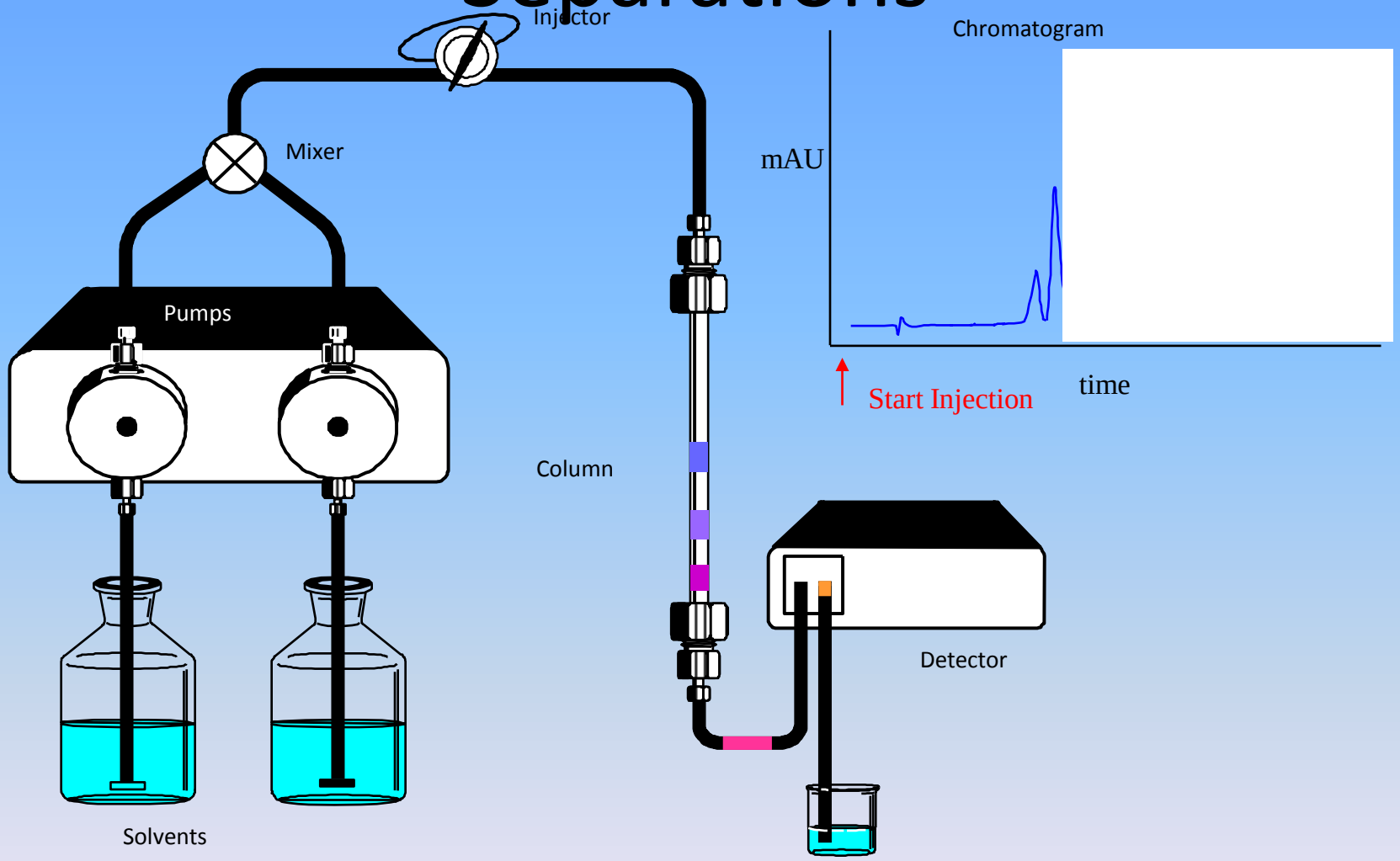
Separations



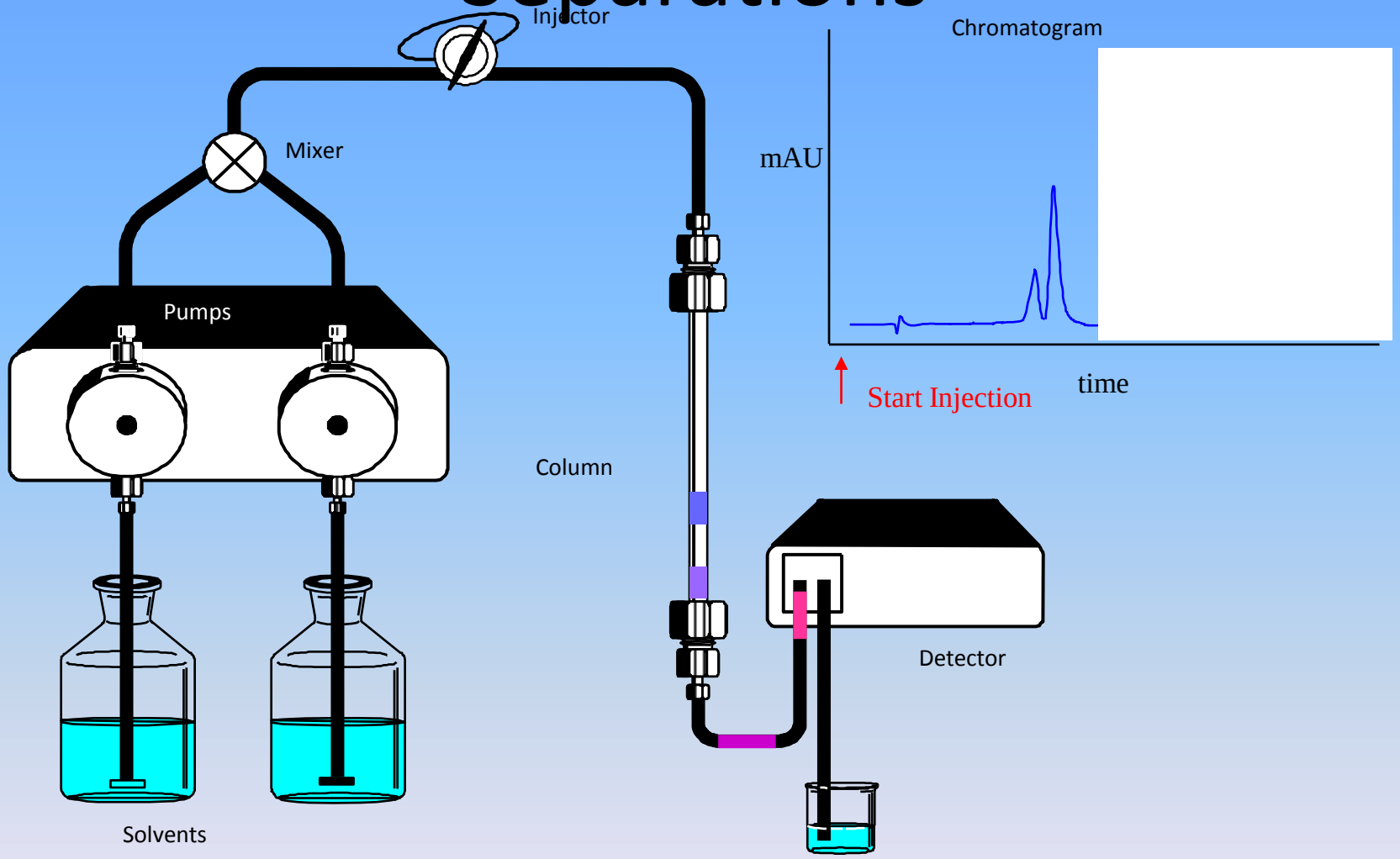
Separations



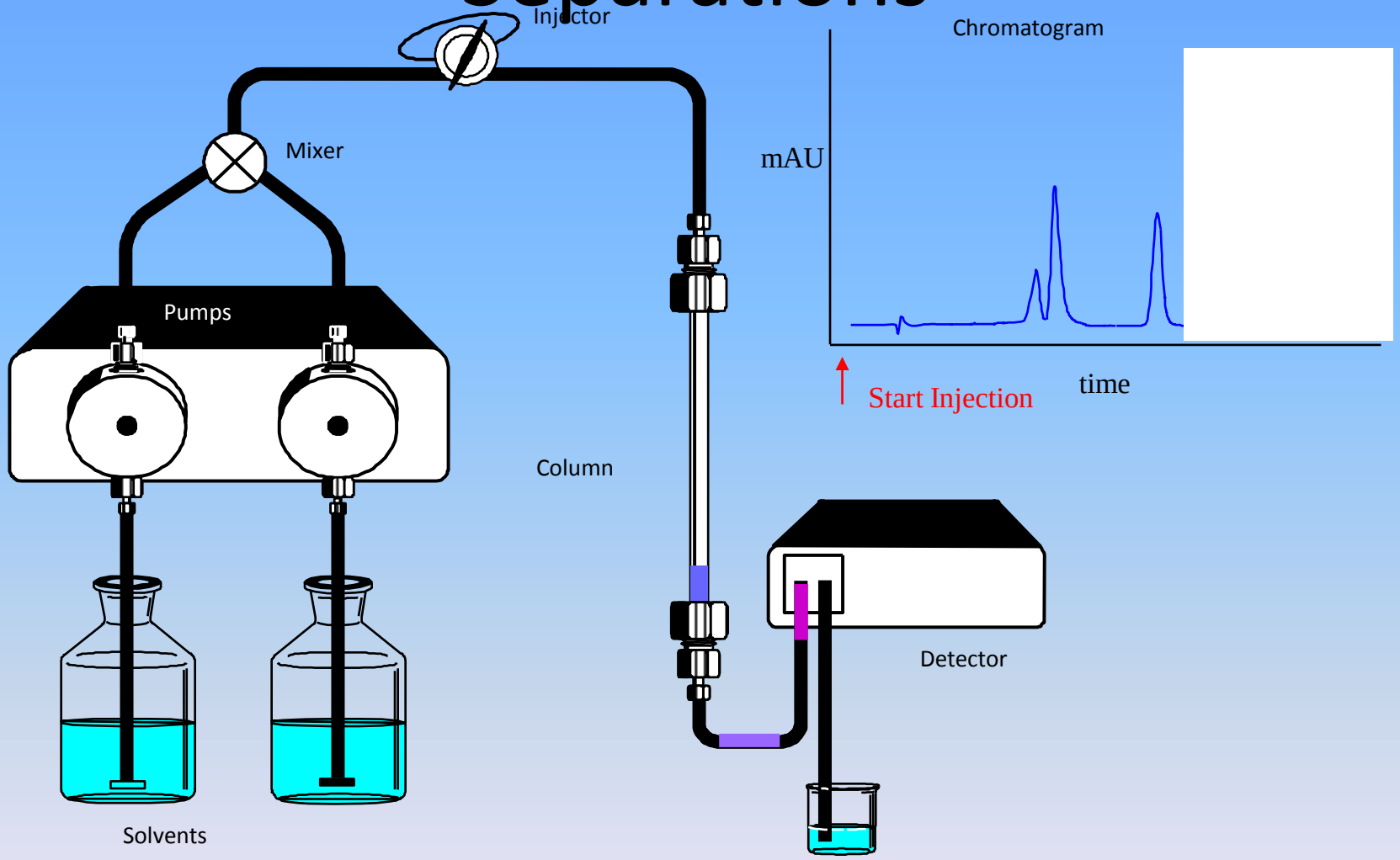
Separations



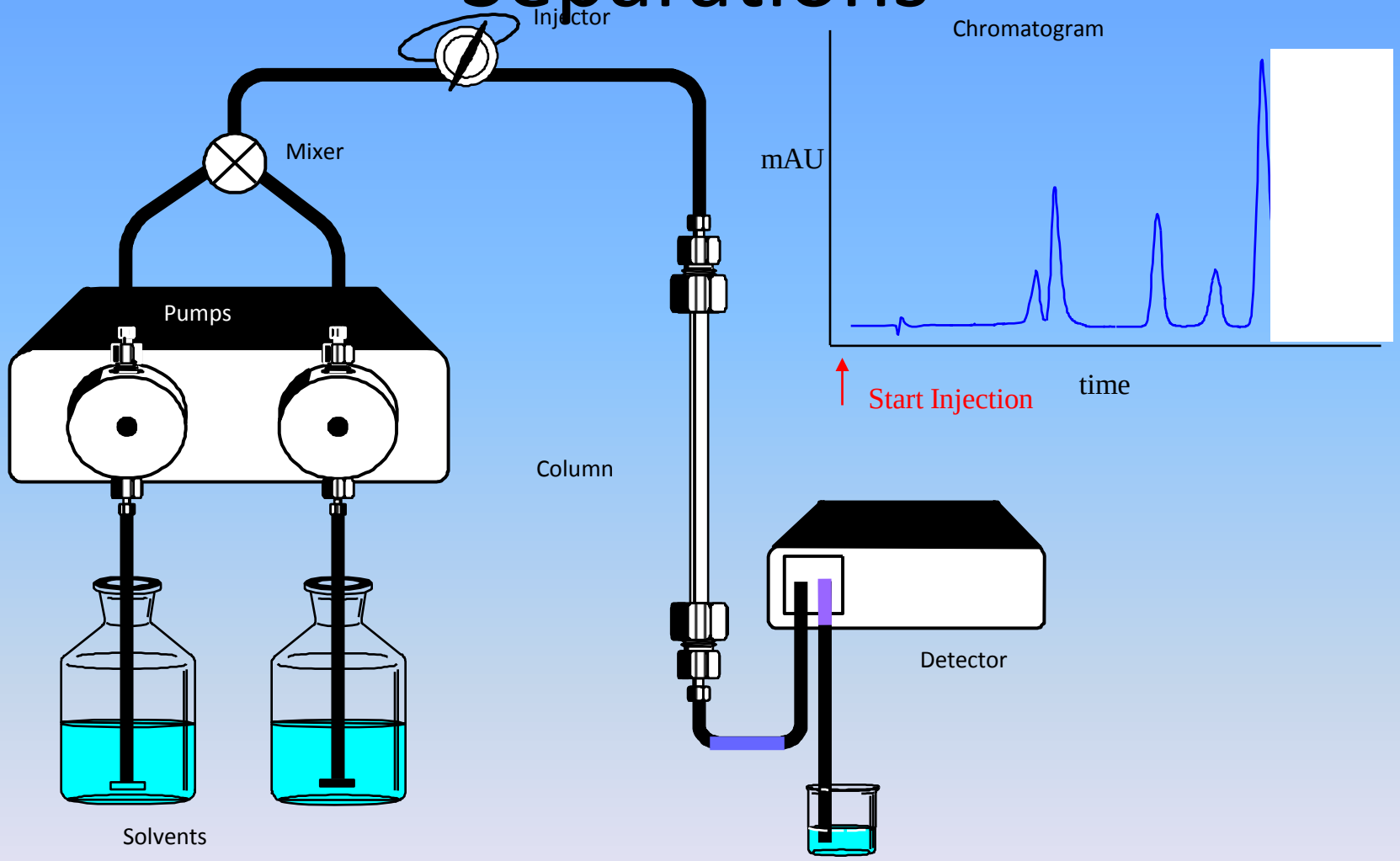
Separations



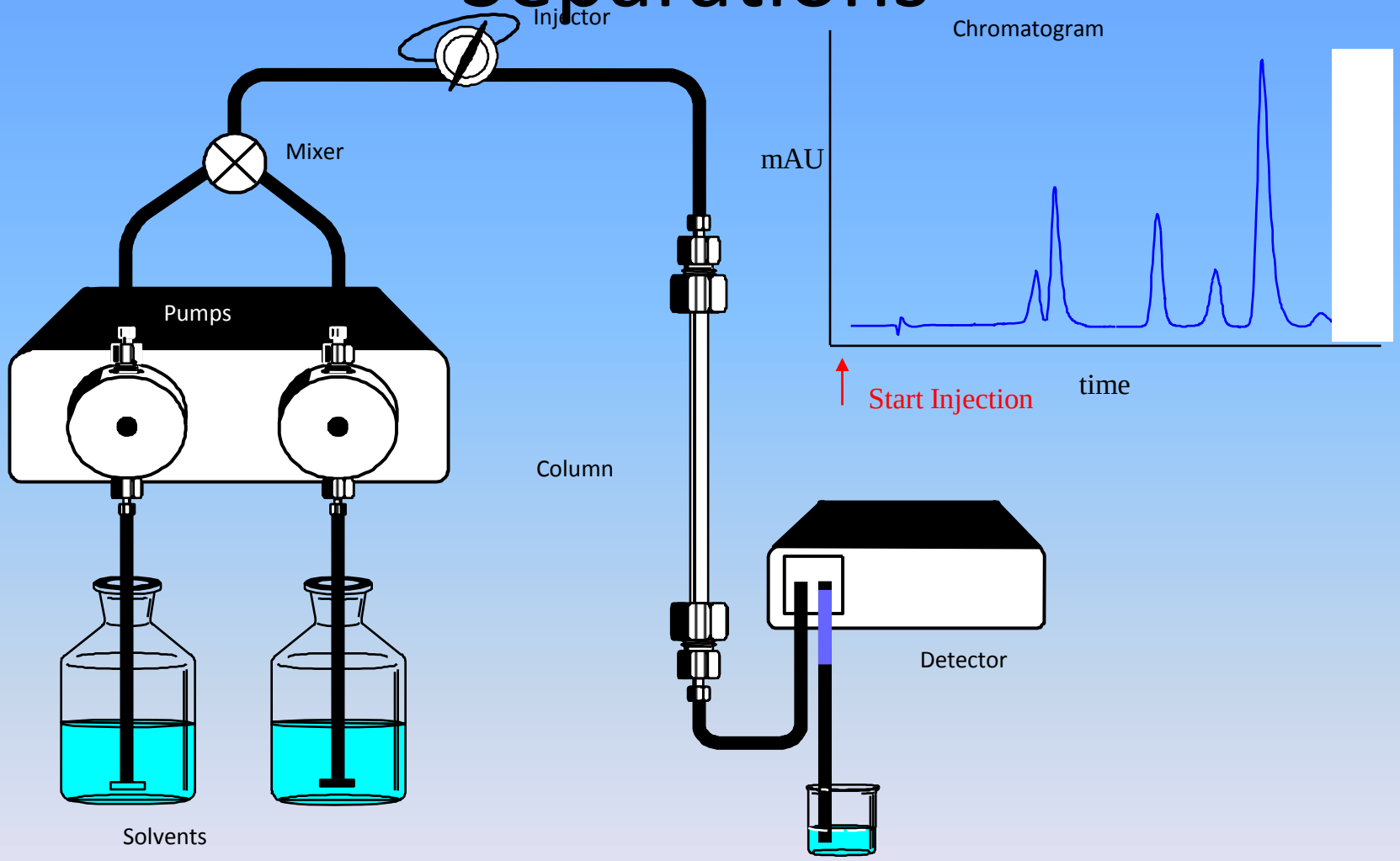
Separations



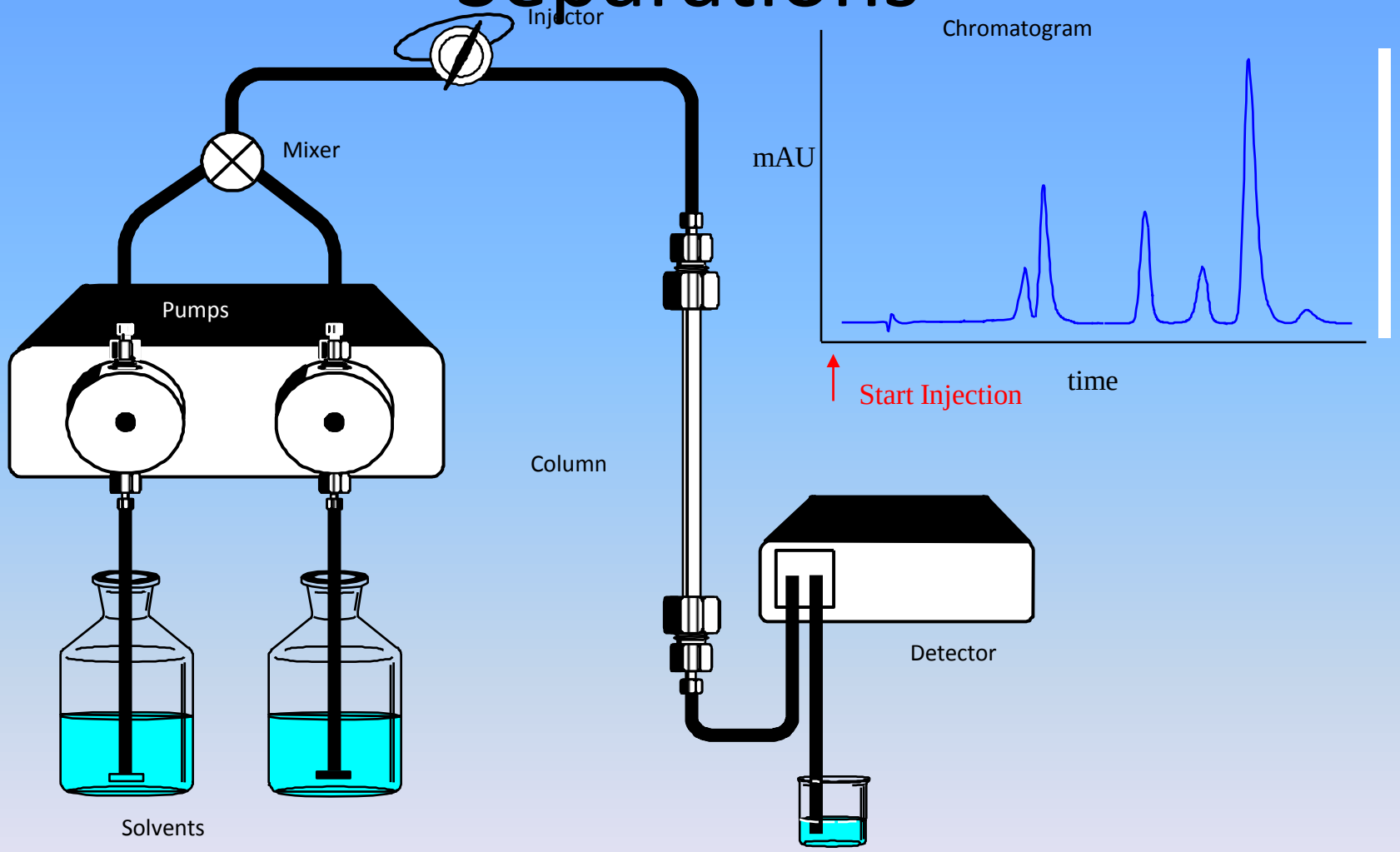
Separations



Separations

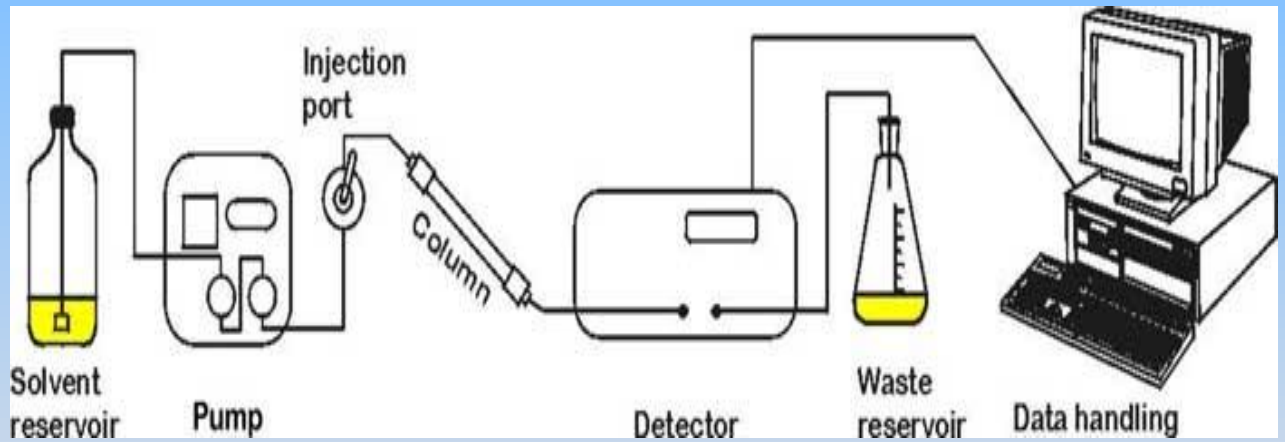


Separations



LE COMPONENTI IN BREVE

- CAMPIONATORE
- VALVOLA DI INIEZIONE
- POMPE
- FILTRI
- COLONNE
- RILEVATORI
- CONTENITORI DI STOCCAGGIO RESIDUI

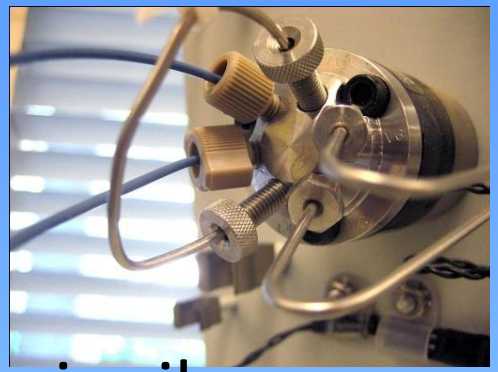


CAMPIONATORE

Per procedere all' analisi si mettono le vials su un apposito "vassoio" in ordine progressivo e poi si imposta la sequenza di lavoro al pc, che non è altro che l' ordine che la macchina seguirà per iniettarle in colonna oltre che alla quantità di ogni prelievo effettuato.

E' formato da un apposito braccio meccanico che preleva dal vassoio la vial e con un ago molto sottile ne estrae il contenuto e lo immette nello strumento.

VALVOLA DI INIEZIONE



Sono **valvole** capaci di alloggiare e trasferire il campione, senza interruzione del flusso della fase mobile attraverso la colonna.

La riproducibilità della quantità di campione introdotto in colonna rappresenta un punto critico per la precisione di un'analisi HPLC.

I sistemi attualmente in uso riescono a raggiungere precisioni relative dello 0,1% su quantità di campioni trasferite in colonna dell’ordine dei microlitri.

POMPE

Consentono il flusso dell'eluente e del campione all'interno del sistema. Vengono utilizzate pompe **pneumatiche** e pompe **meccaniche** ma tutte devono fornire un **flusso costante e riproducibile**. Devono inoltre:

-garantire la stabilità della pressione generata (per non creare rumore nel cromatogramma)

- erogare flussi di fase mobile nell'intervallo tra 0,1 e 10 ml/min

-garantire la riproducibilità del flusso relativa migliore dello 0,5%

-consentire rapide operazioni di ricambio della fase mobile

-avere un adeguato sistema di smorzamento delle pulsazioni

-avere una notevole inerzia chimica e resistenza alla corrosione

-fornire elevate pressioni in ingresso

- essere poco rumorose,poco ingombranti, prive di vibrazioni eccessive.

ALCUNI TIPI DI POMPE

-POMPA ALTERNATIVA A PISTONE (più diffusa)

-POMPA A SIRINGA

-POMPA PNEUMATICA

COLONNE

Sono la parte del sistema in cui il campione viene effettivamente separato. Gli analiti possono raggiungere diverse velocità di eluizione, in base all’interazione con la fase stazionaria contenuta nella colonna e con l’eluente.

Il materiale più impiegato per la costruzione dell’esterno delle colonne per HPLC è l'acciaio inossidabile levigato, se si opera a pressioni inferiori a 10 atm si usano anche colonne in vetro spesso.

La lunghezza delle colonne è di solito compresa tra 10 e 30 cm. Il diametro interno è compreso tra 2 e 4,6 mm e il diametro delle particelle del riempimento tra 3,5 e 10 µm.

TIPI DI COLONNE

1)Colonne classiche per HPLC:
-materiale: acciaio o vetro ricoperto di metallo
-lunghezzavariabile da 10 a 30 cm
-diametro interno da 4 a 10 mm
-impaccate con particelle di diametro da 5 a 10 µm
-piatti teorici: da 40.000 a 60.000 piatti per metro

2)Micro-colonne per HPLC:
-lunghezzadai 3 ai 6.5 cm
-diametro interno da 1 a 4-6 µm
-impaccate con particelle di diametro da 3 a 5 µm
-piatti teorici: >100.000 per metro
-maggiore velocitàoperativa e minore consumo di fase mobile

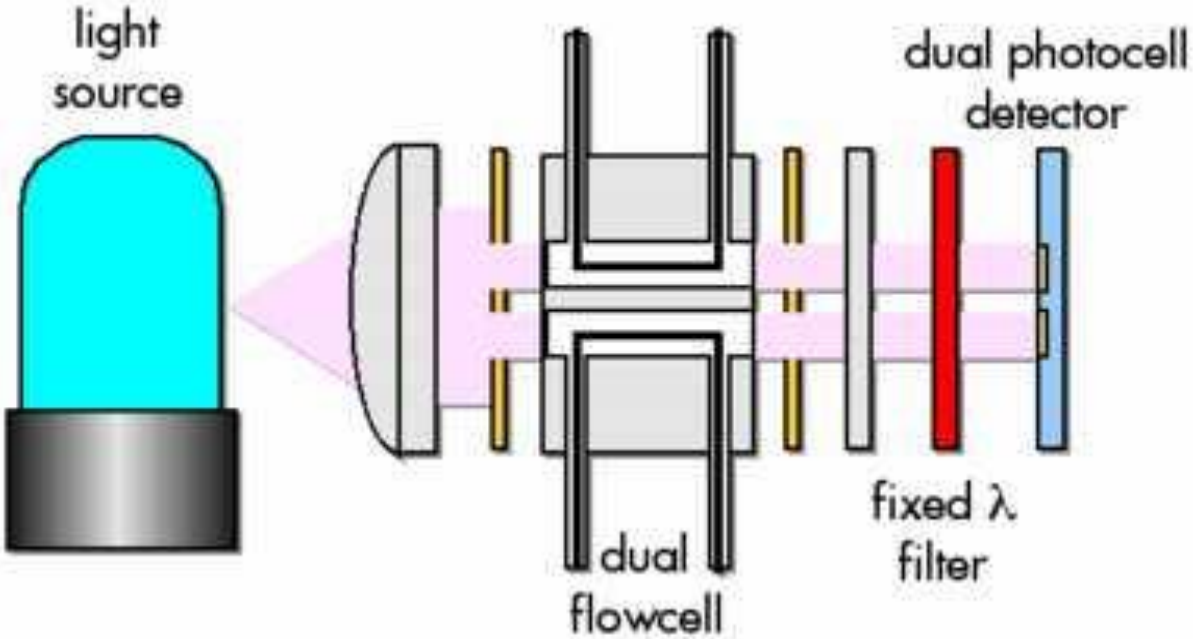
RILEVATORI

Caratteristiche dei rivelatori per HPLC :

- Sensibilità adeguata
- buona stabilità e riproducibilità
- risposta lineare per più ordini di grandezza
- tempo di risposta breve
- elevata facilità d'uso e affidabilità
- uniformità di risposta nei confronti di tutti gli analiti o al contrario elevata specificità per particolari composti
- rivelazione non distruttiva
- piccolo volume interno per evitare allargamento delle bande

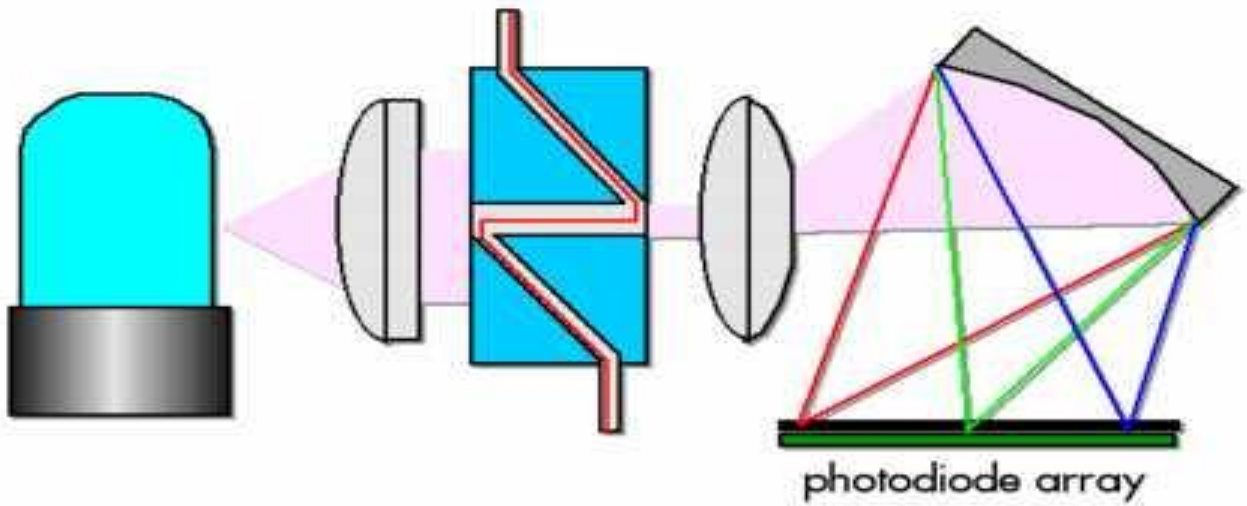
Tipologie: i rivelatori più usati sono ad assorbimento UV. Vi sono poi i metodi a fluorescenza (per le proteine), ad indice di rifrazione, a costante dielettrica, rivelatori elettrochimici, a spettrometria di massa.

UV/Vis detector - filter type

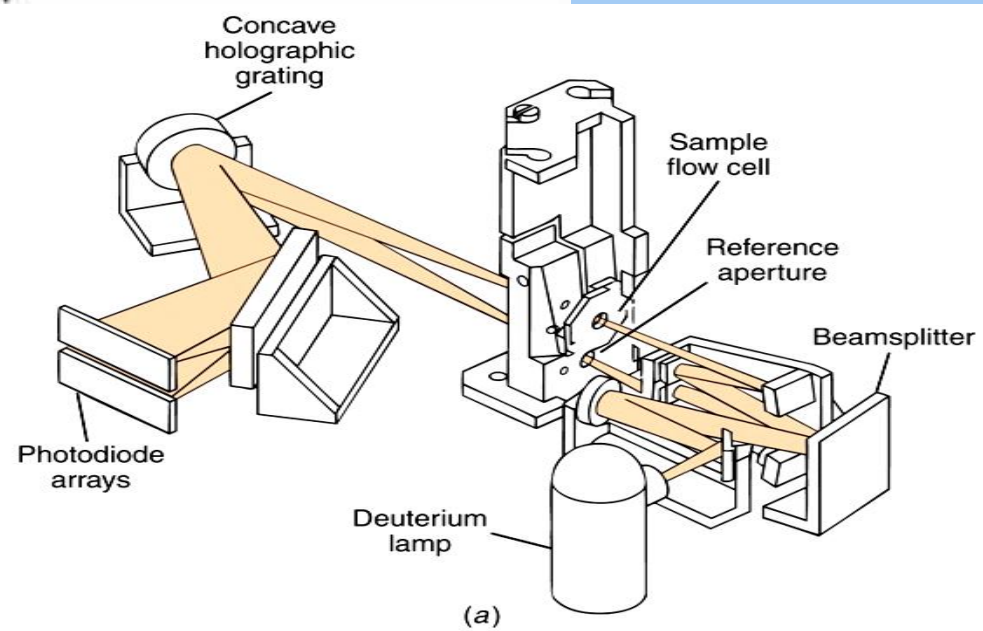


If the filter is replaced by a monochrometer, you end up with a variable wavelength UV/Vis system

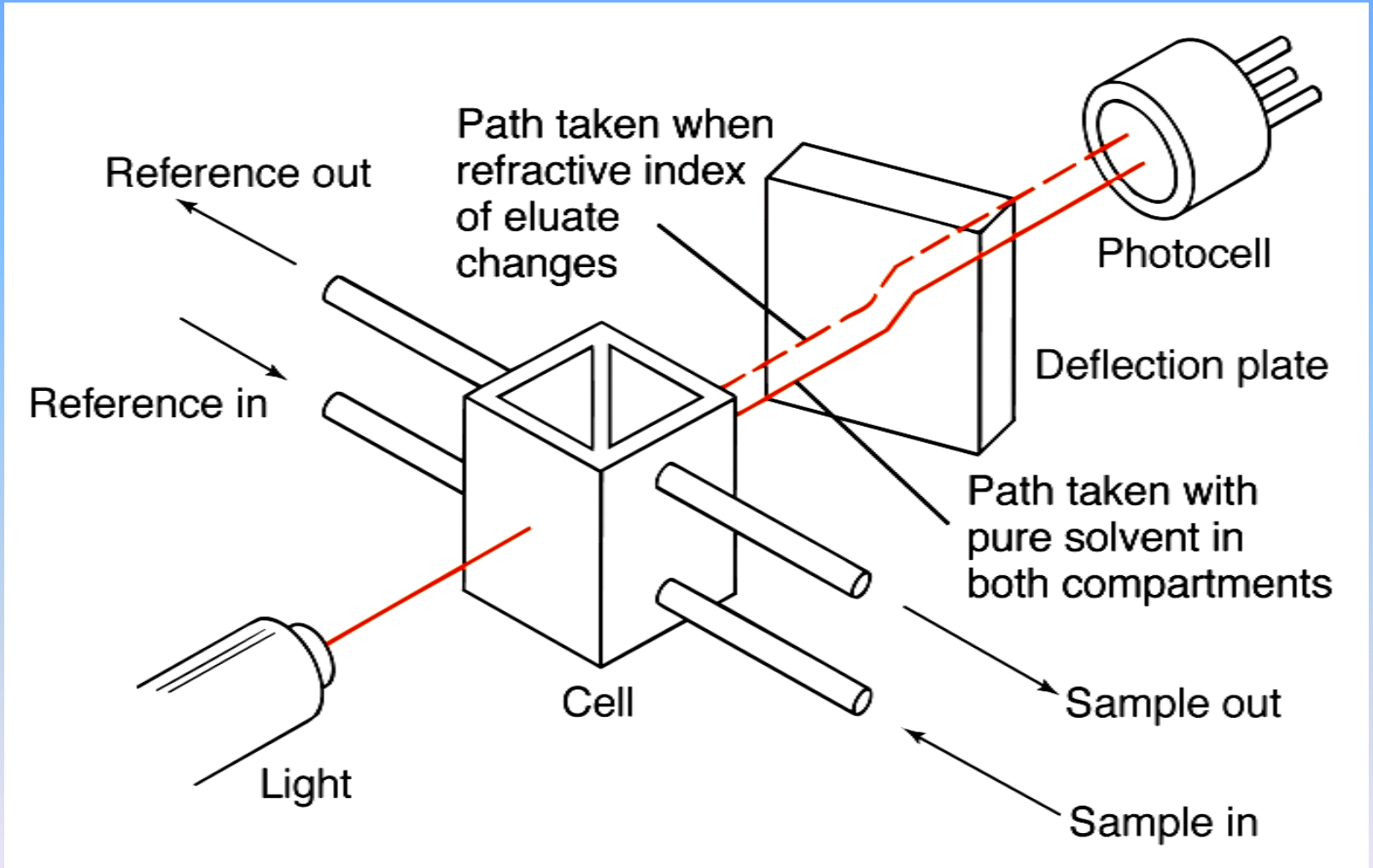
Photodiode array detector



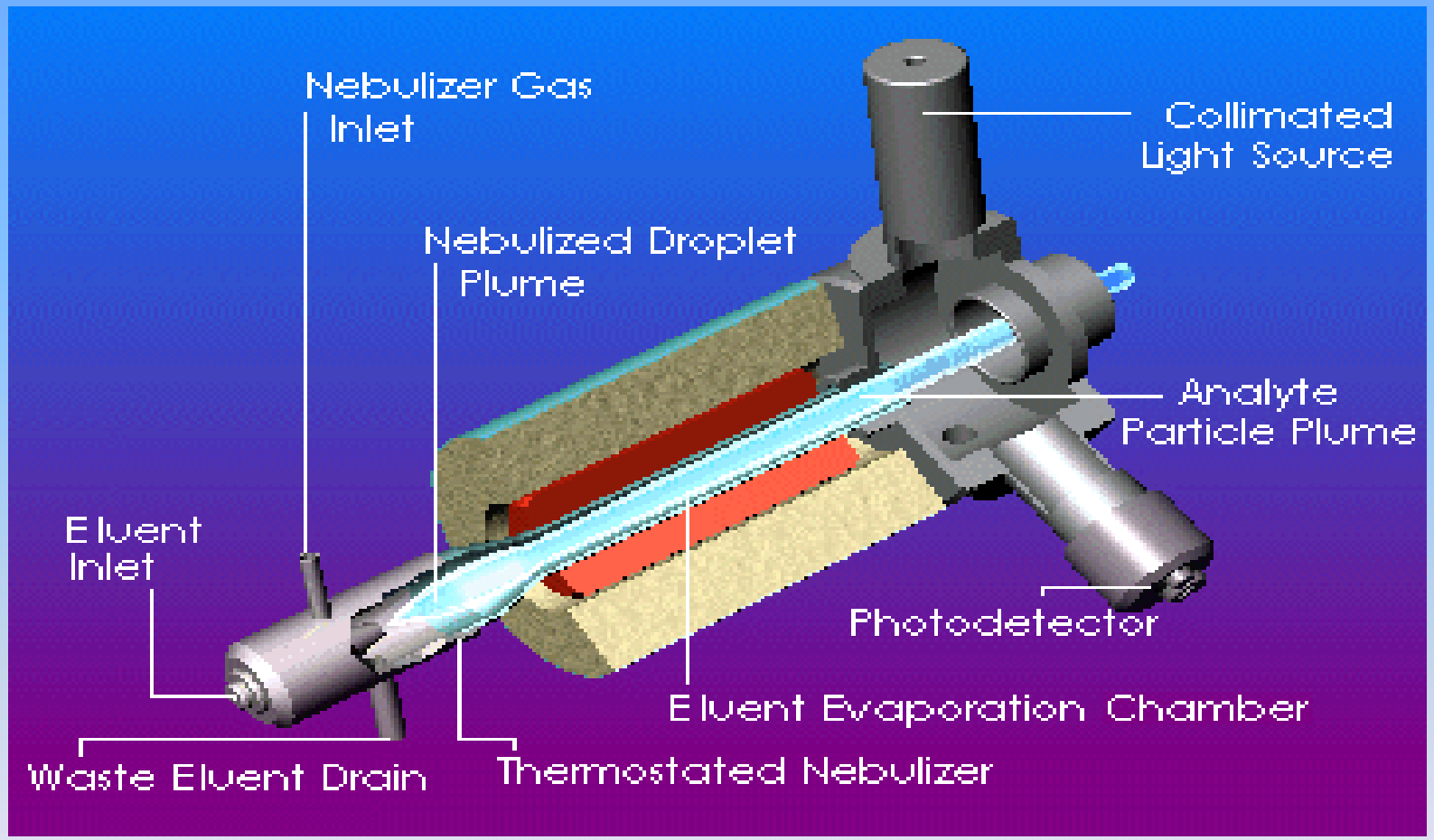
The photodiode array allow you to simultaneously monitor a range of λ or obtain complete spectra.



DETECTOR RIFRATTOMETRICO



DETECTOR A SPETTROMETRO DI MASSA



CLASSIFICAZIONE DELLE TECNICHE

L'HPLC può essere classificata in diversi modi:

- **Cromatografia "normale"eseguita con fase stazionaria polare e fase mobile apolare.**
- **Cromatografia in fase inversa che utilizza fasi stazionarie apolari e fasi mobili polari.**

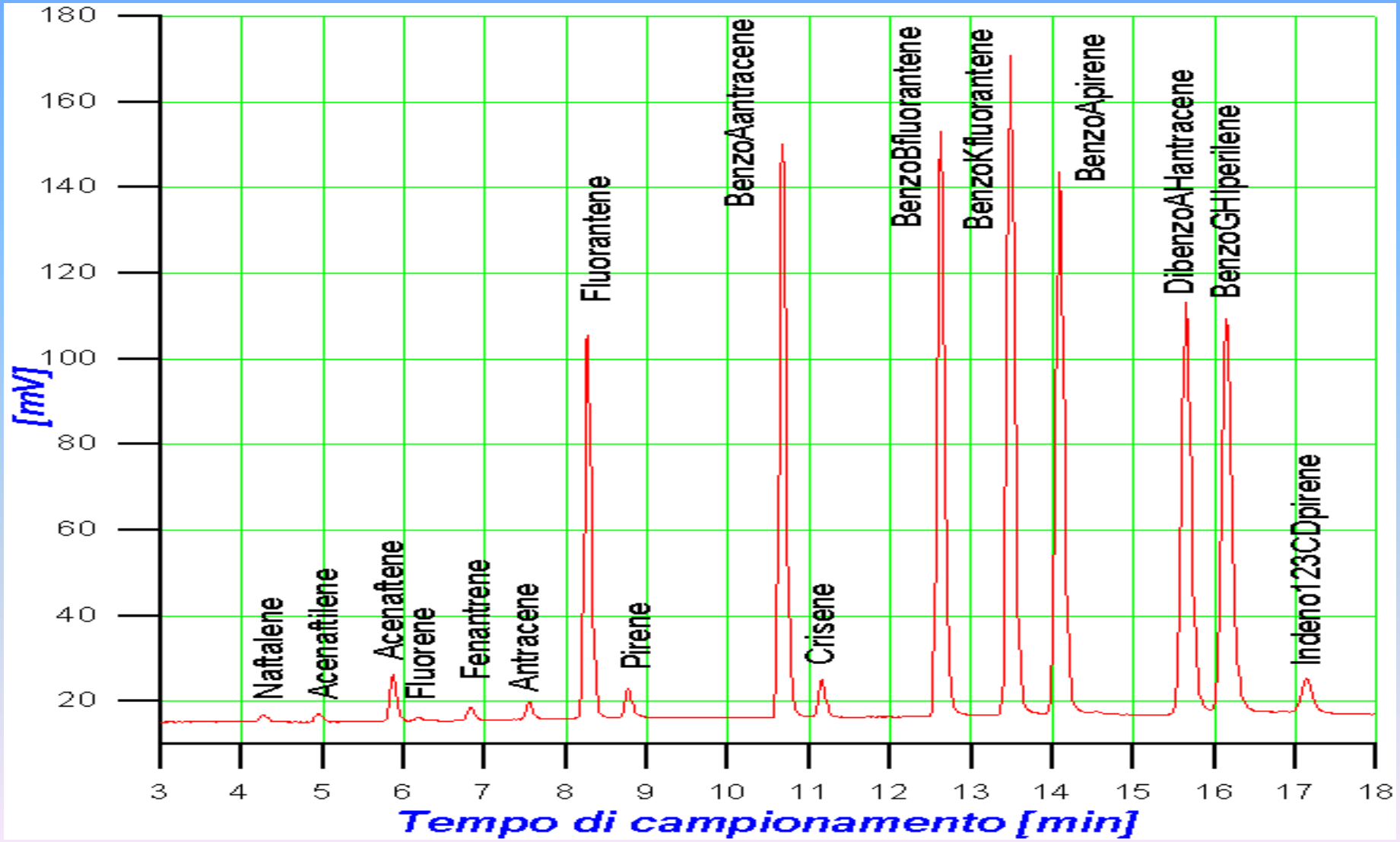
Se ci si basa sul meccanismo principale della separazione e sulla natura delle fasi:

- **Cromatografia di assorbimento liquido-solido (LSC)**
- **Cromatografia di ripartizione liquido-liquido (LLC)**
- **Cromatografia di esclusione (SEC)**
- **Cromatografia di scambio ionico (IEC)**
- **Cromatografia di coppia ionica (IPC)**

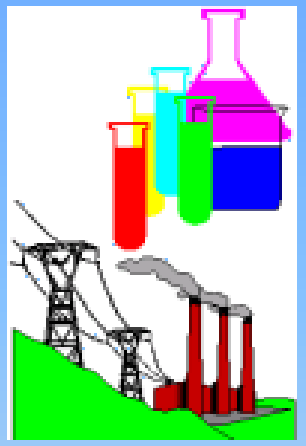
Infine, se si fa riferimento alle particolari caratteristiche della fase stazionaria, si parla di:

- **Cromatografia su fase legata (BPC)**
- **Cromatografia su fase chirale (CPC)**

ESEMPIO DI UN CROMATOGRAMMA



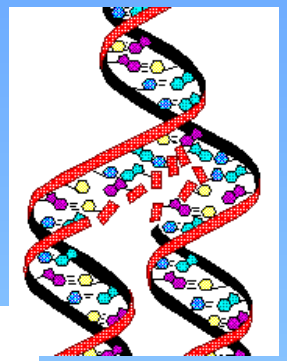
CAMPI DI APPLICAZIONE



Controllo materiali

polistirene

ftalati



Bioscienze

proteine
peptidi
nucleotidi

Farmaceutico

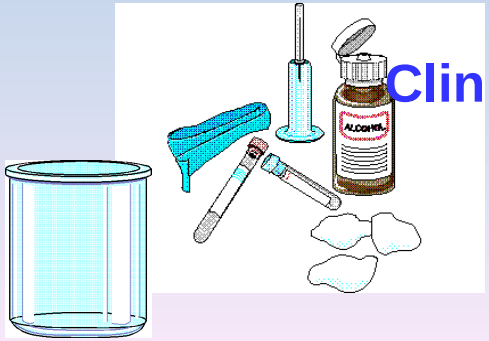
tetracicline
cortisonici
antidepressivi
barbiturici

Prodotti di consumo

lipidi
antiossidanti
zuccheri

Ambientale

Idrocarburi poliaromatici
Ioni inorganici
Erbicidi e pesticidi



Clinico

amino acidi
vitamine
homocisteine

SITOGRAFIA

WWW.CHROMEACADEMY.IT

WWW.WIKIPEDIA.IT

WWW.AGILENT.IT

WWW.GOOGLE.IT

WWW.EXOVA.COM