

## 19.4 TECNICA OPERATIVA

### 19.4.1 Lastrine

Molte ditte specializzate offrono lastrine per TLC pronte per l'uso a prezzi relativamente contenuti. Tuttavia, se si deve effettuare un numero elevato di separazioni, diventa conveniente prepararsele da sé. Se si riesce ad acquisire la necessaria manualità ed esperienza, è possibile preparare lastrine di qualsiasi tipo, con qualsiasi spessore e si risparmia tempo in fase di sviluppo, perché la velocità di eluizione è mediamente superiore rispetto a quella ottenuta con le lastrine già confezionate.

Le lastrine già confezionate hanno una lunghezza standard di 20 cm (sono rare quelle da 4, 8 o 10 cm), larghezza di 5, 10 o 20 cm e spessori di  $0,2 \div 0,25$  mm.

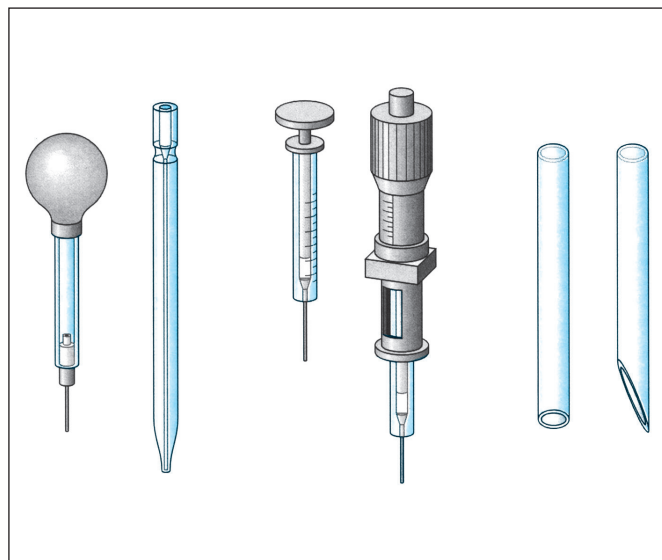
In genere i campioni vengono depositi l'uno di fianco all'altro, a 1-1,5 cm di distanza; in alcuni casi, invece, si sagoma la lastrina per formare canali entro cui far correre le macchie.

### 19.4.2 Deposizione del campione

Questa è una fase particolarmente delicata dell'analisi; il campione deve essere depositato alla base della lastrina, come macchia (*deposizione a goccia*) o come striscia (*deposizione lineare*), nel modo più compatto possibile. La linea di partenza delle macchie o delle strisce viene tracciata con una matita morbida di grafite a 1-1,5 cm dal bordo inferiore della lastrina (in ogni caso sopra il livello raggiunto dall'eluente).

**Figura 19.8**

Dispositivi per la deposizione dei campioni in TLC: (a) microcapillare tarato e non tarato; (b) siringa di precisione e micrometrica; (c) puntali.

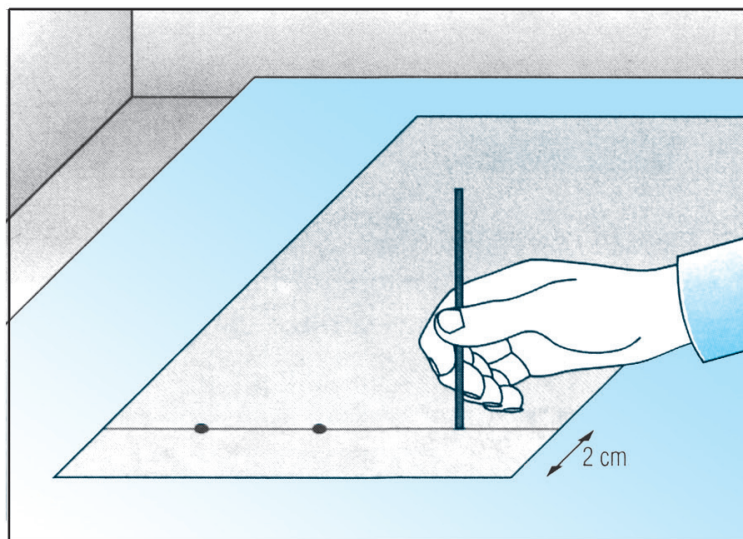


**Deposizione a goccia.** Si usano siringhe micrometriche (capacità da 0,2 a 2  $\mu\text{L}$ ) o microcapillari, che consentono di depositare singole macchie di diametro costante di 2-3 mm al massimo (►fig. 19.8c). Il capillare per la deposizione del campione può anche essere preparato in laboratorio, ma in questo caso non è nota la capacità.

Il campione deve essere depositato senza abraderlo lo strato (ciò provocherebbe una migrazione distorta delle macchie); per questo motivo si usano preferibilmente siringhe con punta dell'ago tagliata a  $90^\circ$ . Si possono depositare da 10 a 100  $\mu\text{g}$  di sostanza; se il campione è molto diluito occorre depositare il campione più volte e perciò è utile

asciugare la macchia con un phon<sup>18</sup> (►fig. 19.9), in modo da evitare un allargamento eccessivo. Sono disponibili in commercio dispositivi, più o meno automatizzati, che consentono di depositare contemporaneamente molte macchie distanziate con regolarità.

<sup>18</sup> Il phon non deve essere avvicinato troppo alle macchie, perché qualche sostanza potrebbe decomporsi per effetto dell'elevata temperatura.



**Figura 19.9**

Deposizione dei campioni su strato sottile; le macchie possono essere asciugate con l'aiuto di un phon, tenuto a distanza opportuna, che fa evaporare il solvente.

**Deposizione lineare.** Può essere effettuata manualmente con microsiringhe, ma in commercio sono disponibili dispositivi di semina lineare della lunghezza desiderata e con diverse capacità che consentono di depositare strisce omogenee e compatte.

### ■ 19.4.3 Camera di eluizione

Si tratta, in genere, di recipienti di vetro di forma e volume opportuni dotati di un coperchio a tenuta (►fig. 19.10). Se si lavora con solventi acquosi e poco aggressivi, si possono usare anche recipienti di plastica.

L'eluente deve essere collocato sul fondo del recipiente, in modo da raggiungere un livello di 0,5-1 cm; poi si chiude ermeticamente il coperchio e si lascia a riposo. Il grado di saturazione della camera di sviluppo è molto importante per la buona riuscita della separazione cromatografica.

Per ottenere una saturazione ottimale si pone nella camera, appoggiato alla parete, un foglio di carta da filtro imbevuto di eluente (►fig. 19.11b).

### ■ 19.4.4 Eluizione

Prima di immergere la lastrina nell'eluente, è opportuno *condizionarla* inserendola per 10-60 minuti nella camera di sviluppo, satura dei vapori dell'eluente, facendo in modo che lastrina non tocchi quest'ultimo. In pratica, si sistema sul fondo della camera uno spessore di materiale inerte (vetro o politene) e vi si appoggia sopra la lastrina. La successiva fase di sviluppo del cromatogramma può essere eseguita con diverse tecniche.

**Sviluppo ascendente.** È la tecnica più diffusa. La lastrina viene appoggiata sul fondo della camera, assicurandosi che il solvente non lambisca le macchie; sono disponibili

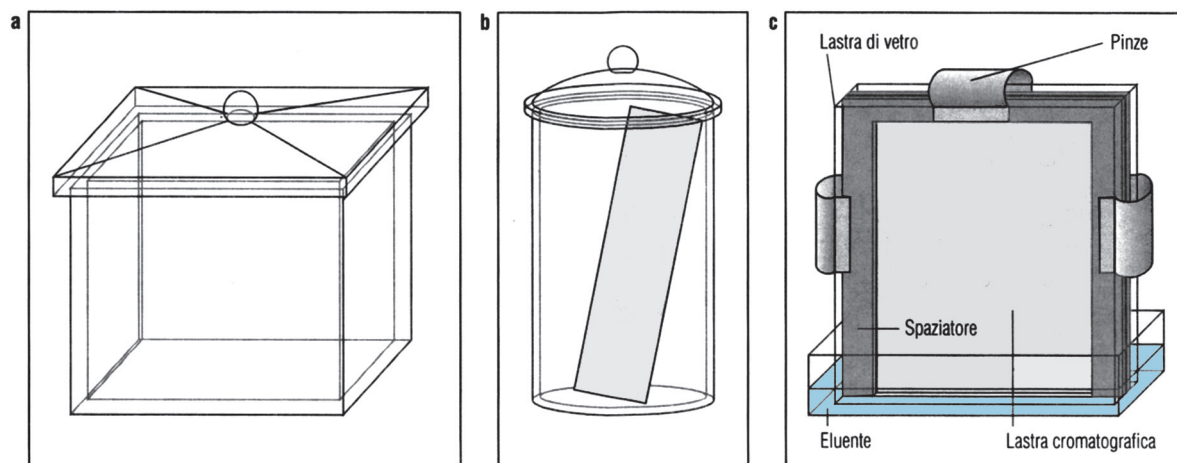


Figura 19.10 Camere di eluizione.

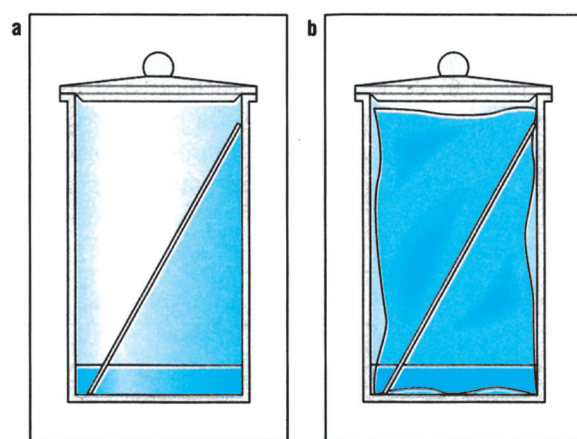


Figura 19.11

(a) La camera di eluizione, per la presenza della lastrina, tende a essere divisa in due zone con diverso grado di saturazione. (b) Per saturare in modo ottimale la camera di sviluppo si inserisce un pezzo di carta da filtro imbevuta di eluente.

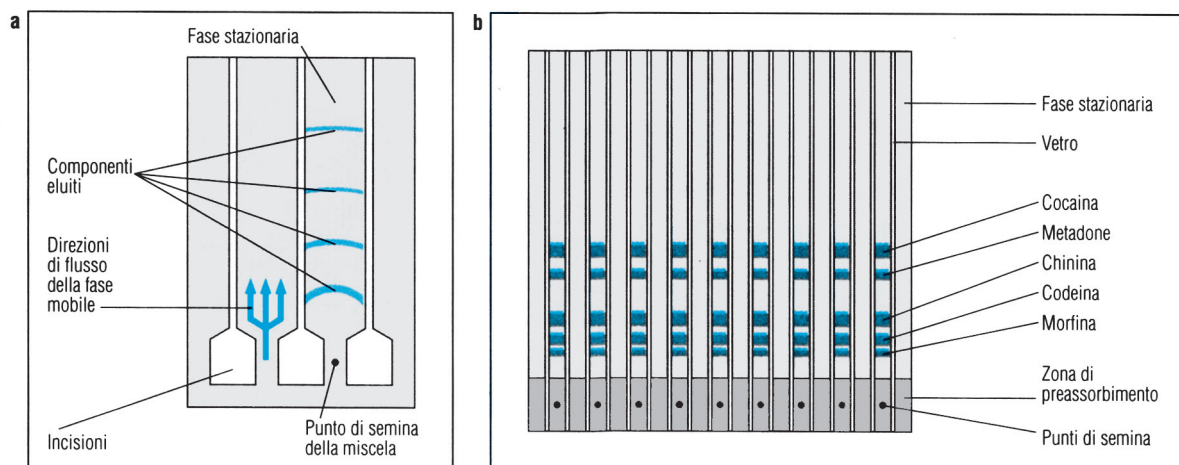
in commercio vaschette munite di uno speciale coperchio che consente di abbassare la lastra senza bisogno di aprire la camera (turbando così lo stato di saturazione) dopo la fase di condizionamento.

<sup>19</sup> In alcuni casi, però, l'eluizione viene spinta oltre, fino a superare il bordo superiore della lastrina.

In genere l'eluente viene fatto correre per 15-17 cm al massimo;<sup>19</sup> i tempi necessari per completare l'eluizione variano da 20 minuti a un paio d'ore.

Lo sviluppo ascendente dà buoni risultati soprattutto se le lastre sono preparate per uno sviluppo *canalizzato*. Wedged ha proposto il seguente procedimento: con una spatola tagliente si incide e si asporta lo strato adsorbente dalla lastra cromatografica fino a raggiungere il materiale di sostegno (►fig. 19.12a). L'eluente si diffonde a partire dal piccolo canale centrale e poi si allarga in tutte le direzioni, per cui i vari componenti della miscela si distribuiscono lungo archi, invece di formare delle macchie. La distribuzione delle sostanze su una superficie più ampia facilita la separazione della miscela.

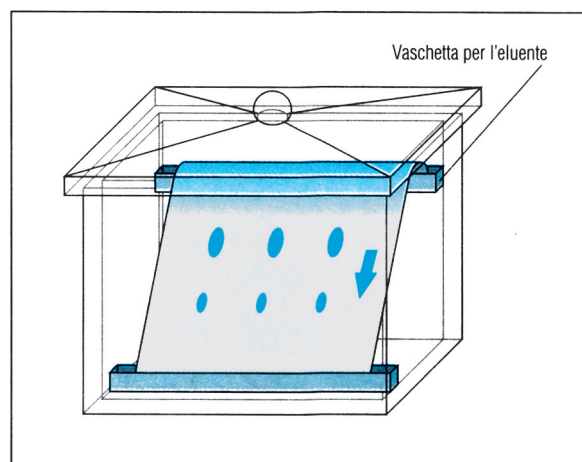
Un altro metodo prevede la formazione di canali stretti di fase stazionaria. Sono disponibili anche lastre canalizzate già pronte (►fig. 19.12b). Con questa tecnica si possono ottenere risultati interessanti sia sul piano qualitativo sia su quello quantitativo; i tensioattivi, per esempio, tendono a diffondersi eccessivamente su gel di silice, ma sulla lastra preparata in questo modo sono costretti a migrare in modo compatto dentro il canale. Inoltre, standardizzando il procedimento è possibile correlare l'altezza ( $h$ ) della colonna imbevuta di sostanza eluita con la quantità di tale sostanza.



**Figura 19.12**

(a) Sviluppo ascendente canalizzato secondo Wedged. Si incidono dei veri e propri canali, asportando la fase stazionaria fino al materiale di sostegno; i componenti della miscela non formano macchie, ma si distribuiscono lungo strisce incurvate. (b) Sviluppo ascendente con lastrina canalizzata Baker 7009-4 (gel di silice 250 mm, 20 × 20 cm) con zona di preadsorbimento. Eluente: acetato di etile/metanolo/acqua/ammoniaca conc. (85 + 13,5 + 1 + 0,5); rivelatore: iodoplatinato.

**Sviluppo discendente.** L'eluente defluisce dall'alto verso il basso della lastrina e perciò è richiesta una speciale camera di eluizione (►fig. 19.13), con una vaschetta posta in alto. Durante lo sviluppo l'eluente si sposta verso il basso per gravità e quindi l'eluizione avviene in tempi più brevi; inoltre si amplifica lo spostamento delle sostanze meno mobili.

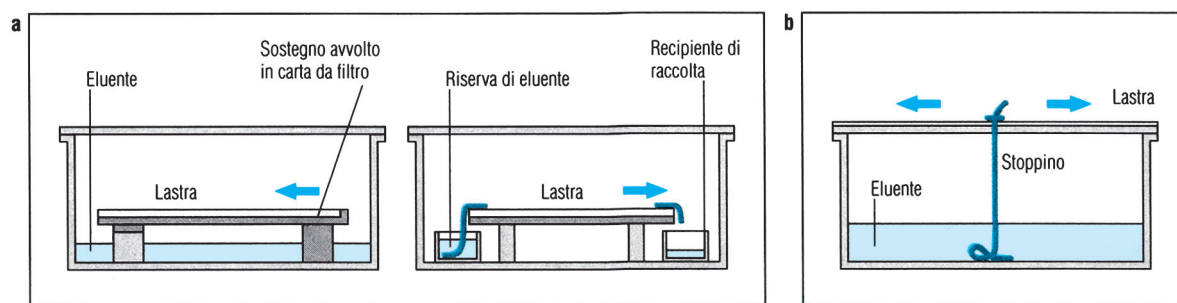


**Figura 19.13**

Camera di eluizione per cromatografia discendente. La vaschetta in alto contiene l'eluente, che durante lo sviluppo, per gravità, scende lungo la lastrina.

**Sviluppo orizzontale.** Non presenta particolari vantaggi rispetto alle tecniche di sviluppo verticale, ma consente di realizzare sistemi più compatti, che facilitano il condizionamento dello strato e possono richiedere minori quantità di eluente; inoltre l'apporto di eluente avviene in modo più regolare rispetto alla cromatografia ascendente.

Lo sviluppo orizzontale può essere realizzato *a senso unico* (►fig. 19.14a) oppure *in senso circolare* o *radiale* (►fig. 19.14b).



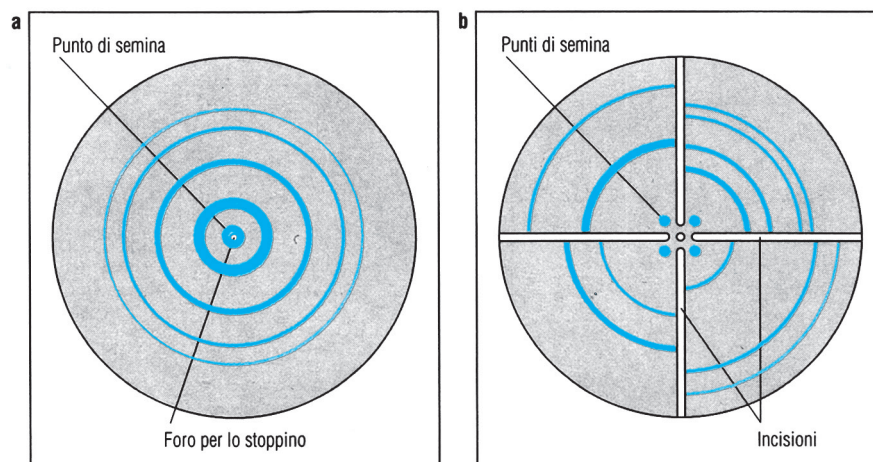
**Figura 19.14**

Camere di eluizione per cromatografia orizzontale. **(a)** Camera per sviluppo a senso unico. Nel tipo più semplice (a sinistra) la lastra cromatografica poggia su due sostegni; uno è avvolto in carta da filtro e consente all'eluente di arrivare fino alla lastra. Alternativamente (a destra), la camera contiene due vaschette, una per l'eluente e l'altra per la raccolta a fine corsa. **(b)** Camera per sviluppo radiale. La lastrina è circolare; l'eluente imbeve lo stoppino e giunge così fino alla lastra.

Nello **sviluppo circolare** le sostanze da separare migrano dal centro di una lastra circolare verso il margine e formano, invece di macchie, degli anelli concentrici (►fig. 19.15a). La lastra ha un foro centrale in cui viene inserito uno stoppino di cotone o di carta da filtro che pesca nell'eluente; la semina viene fatta intorno al foro centrale oppure direttamente sulla parte di stoppino che ne fuoriesce. Per effettuare più semine contemporaneamente la lastra deve essere incisa in modo da delimitare la superficie disponibile per ciascuna sostanza; si realizza così uno sviluppo in **senso radiale** (►fig. 19.15b).

**Figura 19.15**

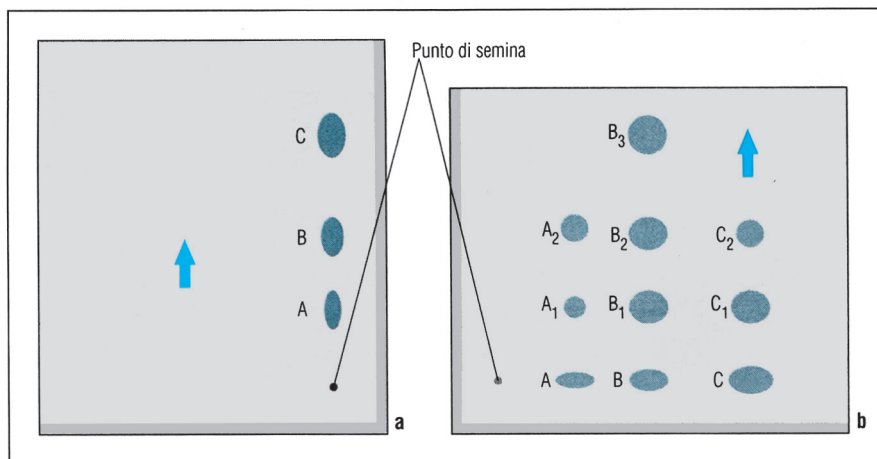
Cromatogrammi realizzati mediante sviluppo circolare: **(a)** sviluppo circolare di un solo campione; **(b)** sviluppo radiale di quattro campioni.



Lo sviluppo circolare (o radiale), a volte, consente di migliorare la separazione fra sostanze che risultano molto ravvicinate nello sviluppo verticale (in una sola direzione). Infatti, espandendosi in direzione radiale, le sostanze eluite si distribuiscono su una superficie sempre più ampia, per cui gli anelli risultano più sottili e quindi meglio separati. Vale la relazione:

$$(R_F)_{\text{radiale}} = \sqrt{(R_F)_{\text{lineare}}} \quad (19.5)$$

**Cromatografia bidimensionale.** Si semina una macchia in un angolo della lastrina e si effettua un primo sviluppo con un eluente opportuno (►fig. 19.16a); poi si ruota la lastrina di 90° e si effettua un nuovo sviluppo con un diverso eluente (►fig. 19.16b). È una tecnica usata in modo particolare per gli aminoacidi.

**Figura 19.16**

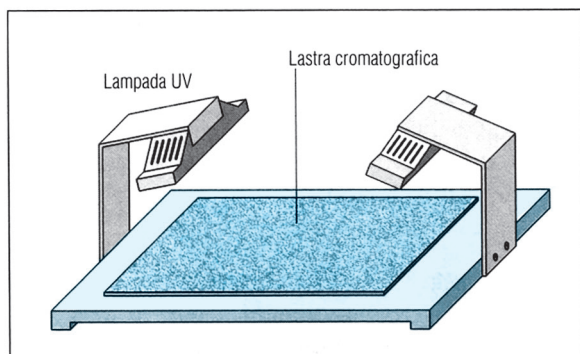
Sviluppo bidimensionale. **(a)** Durante la prima eluzione si sono separati i tre componenti A, B, C. **(b)** Con la seconda eluzione, effettuata ruotando la lastrina di 90° e con un diverso solvente, la macchia di ciascuna sostanza risulta ulteriormente risolta nei suoi componenti. (La freccia indica la direzione del flusso dell'eluente.)

### 19.4.5 Rivelazione delle sostanze separate

Quando lo sviluppo è completato si estrae la lastra dalla camera di eluizione, si segna con una matita morbida il livello raggiunto dal fronte del solvente e si asciuga lo strato all'aria o con l'aiuto di un phon. Se le sostanze eluite non sono termolabili si può porre la lastra in stufa per qualche minuto a 100-105 °C. Esistono diversi metodi per rendere visibili le macchie di sostanze non colorate.

**Rivelazione con luce UV.** Se le sostanze da rivelare sono fluorescenti è sufficiente illuminare la lastrina con una o più lampade UV che emettano a 254 e 366 nm (►fig. 19.17); si osservano così delle macchie luminose su fondo scuro. Se invece le sostanze da rivelare non sono fluorescenti si può usare una lastra la cui fase stazionaria, prima o dopo l'eluizione, viene impregnata di una sostanza fluorescente ai raggi UV. Illuminando la lastra con le apposite lampade si osservano delle macchie scure su fondo fluorescente. Gli indicatori di fluorescenza<sup>20</sup> più usati sono:

- un silicato di zinco e magnesio attivato, che presenta un massimo di assorbimento a 254 nm e dà una fluorescenza verde;
- un pigmento inorganico che ha un massimo di assorbimento a 366 nm e dà una fluorescenza blu.

**Figura 19.17**

Lampade UV per rivelare le sostanze separate su lastra. Se le sostanze da rivelare non sono fluorescenti si usano lastre impregnate di una sostanza fluorescente opportuna.

In alcuni casi, dopo l'eluizione si spruzza la lastrina con indicatori che reagiscono con le sostanze da rivelare formando composti fluorescenti. Gli indicatori più usati sono:

<sup>20</sup> Le lastre e gli adsorbenti già miscelati con questi indicatori recano le sigle: UV<sub>254</sub> o F<sub>254</sub>; UV<sub>366</sub> o F<sub>366</sub> oppure anche UV<sub>254+366</sub> (o F<sub>254+366</sub>).

- rodamina B (soluzione allo 0,025-0,05% in etanolo), adatta per usi generali;
- rodamina 6G (soluzione all'1% in acetone), adatta per rivelare i lipidi;
- diclorofluorescina (soluzione allo 0,01-0,2% in etanolo), adatta per usi generali.

**Rivelazione con reagenti chimici.** Questi reagenti, vaporizzati sulle sostanze eluite, formano con esse composti colorati. Per la vaporizzazione si usa un nebulizzatore a pompetta (► fig. 19.18a) o, ancora meglio, una bomboletta spray di gas inerte (► fig. 19.18b).<sup>21</sup>

Per una distribuzione ottimale dell'aerosol sulla lastrina è consigliabile tenere il nebulizzatore a circa 20-30 cm di distanza e distribuire il reagente con movimento lento, continuo e costante, seguendo il tracciato<sup>22</sup> mostrato in figura 19.19. Spesso, per accelerare la formazione delle macchie colorate o per renderle più evidenti, si pone la lastrina in stufa per alcuni minuti.

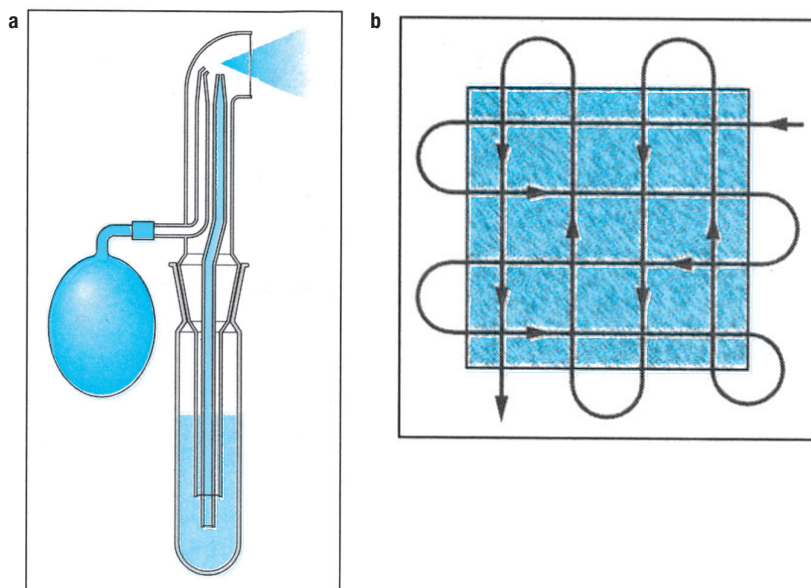
In tabella 19.5 riportiamo un elenco dei rivelatori chimici di più largo impiego.

<sup>21</sup> Spesso si tratta di sostanze dannose alla salute, perciò è consigliabile lavorare sotto cappa o in un box con aspirazione dei vapori.

<sup>22</sup> Si deve assolutamente evitare che il reagente *inondi* completamente la lastrina.

**Figura 19.18**

(a) Nebulizzatore manuale. In alternativa si usano bombolette spray a gas inerte; (b) schema del tracciato per spruzzare il rivelatore sulla lastra cromatografica.



**Tabella 19.5**

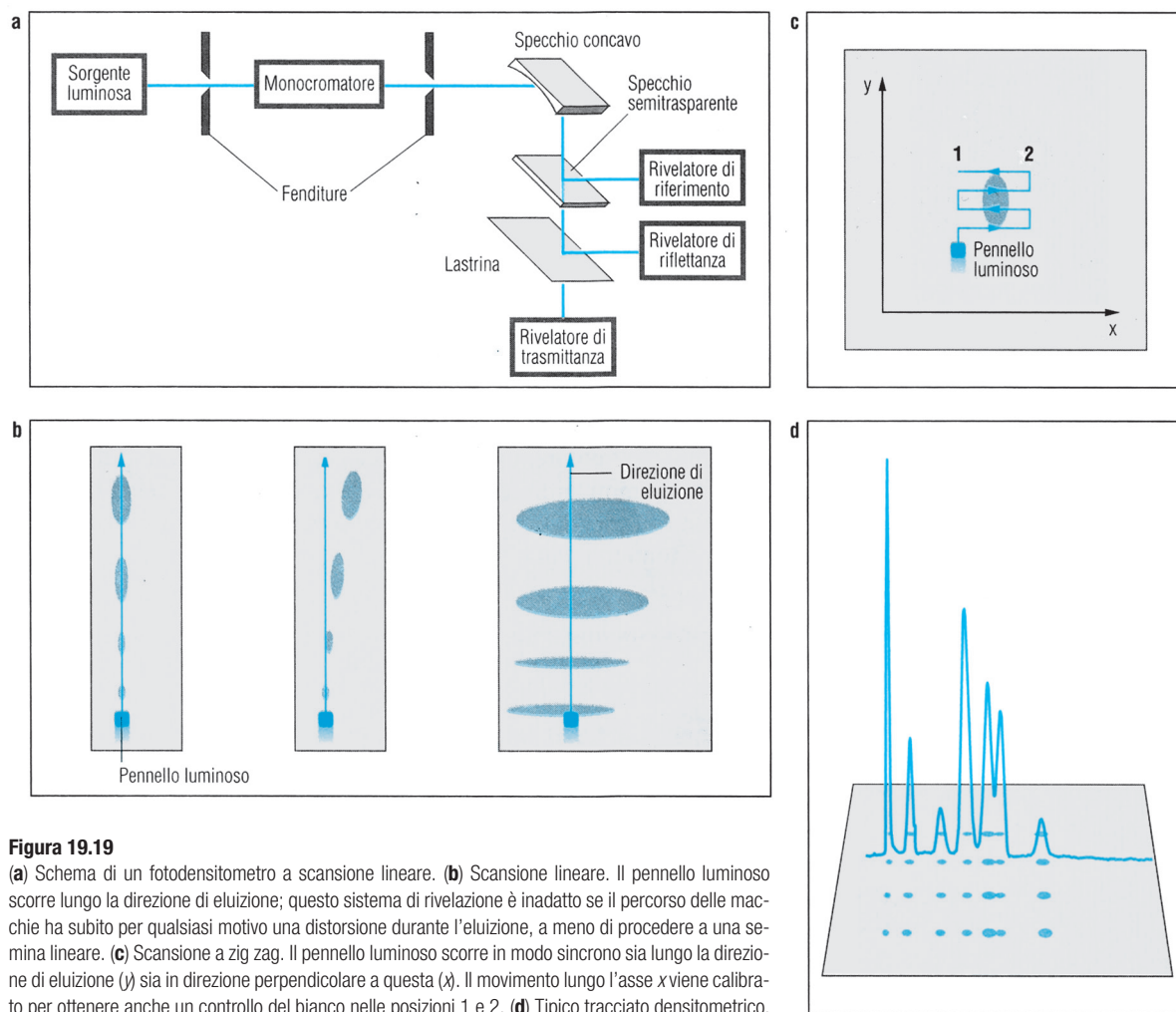
**Coloranti di uso generale in TLC e PC.**

Rivelatore	Preparazione	Utilizzo
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> concentrato, miscela cromica	Nebulizzare sulla lastrina e porla in stufa. I composti organici si carbonizzano formando macchie scure, e a volte (regolando i tempi di riscaldamento) colorazioni specifiche.	Uso generale, efficace per sostanze organiche.
Vapori di iodio	Riscaldare debolmente lo iodio in un piccolo becher e porlo in una camera di sviluppo chiusa contenente la lastrina da rivelare. Le macchie appaiono più o meno scure sul fondo della lastrina.	Uso generale, adatto per composti contenenti doppi legami o che formino addotti.
KMnO <sub>4</sub> acido	Miscelare 0,5 g di permanganato con 15 mL di H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> concentrato. <b>Attenzione:</b> il minimo urto può causare esplosione della miscela. Si consiglia perciò di preparare questo rivelatore in H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> diluito e di riscaldare le lastrine in stufa a 100 °C.	Usi generali.
KMnO <sub>4</sub> alcalino	Permanganato alcalino: soluzione allo 0,5% in NaOH 1 N. Nebulizzare sulla lastrina e riscaldare in stufa a 100 °C.	Zuccheri e polialcoli in generale.
KMnO <sub>4</sub> neutro	Soluzione allo 0,05% in acqua.	Composti facilmente ossidabili.
Soluzione di iodio	Soluzione allo 0,5% in etanolo o cloroformio.	Composti azotati.

Nitrato di argento ammoniacale	Miscela 1 + 5 di una soluzione 0,1 N di AgNO <sub>3</sub> con una soluzione 5 N di NH <sub>3</sub> . La soluzione va preparata al momento perché altrimenti possono verificarsi esplosioni. Dopo il trattamento scaldare per 5-10 minuti la lastrina (o la striscia di carta) a 105 °C finché non si notano macchie scure.	Sostanze riducenti e zuccheri.
Alizarina	Soluzione satura in etanolo. Dopo aver nebulizzato porre la lastrina umida in una camera contenente NH <sub>3</sub> al 25%. Si formano macchie di diversi colori a seconda dei cationi eluiti.	Cationi.
Solfuro d'idrogeno	Esporre la lastrina al gas, fatto sviluppare (per es. riscaldando della tioacetammide) in una camera di sviluppo chiusa, fino alla comparsa di macchie scure.	Cationi dei metalli pesanti.
Molibdato di ammonio	Spruzzare una soluzione all'1% di molibdato di ammonio. Essiccare la lastrina e spruzzare ancora con una soluzione all'1% di cloruro di stagno(II). Riscaldare a 105 °C per 3-4 minuti.	Fosfati.
Anisaldeide	Aggiungere 1 mL di H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> concentrato a 0,5 mL di anisaldeide sciolta in 50 mL di CH <sub>3</sub> COOH glaciale. Nebulizzare sulla lastrina e riscaldare a 105 °C.	Steroidi e terpeni.
Anisaldeide	Aggiungere 0,5 mL di H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> concentrato e 0,1 mL di CH <sub>3</sub> COOH glaciale a 0,5 mL di anisaldeide sciolta in 9 mL di etanolo. Nebulizzare e mettere in stufa a 90-100° C per 5-10 minuti.	Zuccheri.
Ninidrina	Aggiungere 3 mL di acido acetico glaciale a 100 mL di una soluzione allo 0,3% di ninidrina in <i>n</i> -butanolo. Nebulizzare e scaldare la lastrina a 100 °C, finché si forma il colore.	Amminoacidi, ammine e amminozuccheri.
Cloruro di antimonio (III)	Sciogliere 25 g di SbCl <sub>3</sub> in 75 mL di cloroformio. Nebulizzare e porre la lastrina per 10 minuti in stufa a 100 °C; infine esporre ai raggi UV.	Glicosidi, steroidi, carotenoidi, flavonoidi, derivati terpenici, vitamine A e D.
Cloruro di antimonio (V)	Sciogliere 20 g di SbCl <sub>5</sub> in 100 mL di cloroformio (soluzione satura).	Vitamine A, D, E, acidi biliari, terpeni, oli essenziali, resine e steroli.
Ammoniaca	Soluzione al 25% in acqua distillata.	Per neutralizzare la ninidrina.
Verde di bromocresolo	Soluzione allo 0,04% in etanolo.	Acidi e basi organiche.
2',7'-dicloro-fluoresceina	Soluzione allo 0,2% in etanolo.	Lipidi saturi e insaturi.
Reattivo di Dragendorff	Soluzione di KI 0,11 M e 0,6 mM di subnitrito di bismuto in CH <sub>3</sub> COOH 3,5 M.	Alcaloidi e composti di azoto quaternario.
Cloruro ferrico	Soluzione al 2,7% in HCl 2 M.	Fenoli e acidi fenolici.
Fluorescamina	Soluzione allo 0,05% in acetone.	Amminoacidi primari, ammine, peptidi e proteine.
Iodoplatinato di potassio	Soluzione allo 0,15% di iodoplatinato di potassio e al 3% di KI in HCl diluito.	Alcaloidi, ammine e composti azotati organici.
Isatina	Soluzione allo 0,2% in metanolo.	Peptidi, prolina, idrossiprolina e altri amminoacidi.
Acido molibdico	Soluzione di MoO <sub>3</sub> allo 0,9% in H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 4,2 M.	Fosfolipidi e derivati.
Orcinolo e cloruro ferrico	Soluzione allo 0,9% di FeCl <sub>3</sub> e allo 0,55% di orcinolo in etanolo acidificato con HCl.	Zuccheri, glicosidi e solfolipidi.
Acido fosfomolibdico	Soluzione al 10% in etanolo.	Lipidi, steroli, lattoni, composti fenolici, chetoacidi, idrossiacidi, acidi grassi insaturi.
Rodamina B	Soluzione allo 0,25% in etanolo.	Lipidi.



**Fotodensitometri.** Sono dispositivi (►fig. 19.19) che permettono di registrare veri e propri cromatogrammi a partire dalle lastrine eluite, eventualmente (ma non necessariamente) sottoposte a colorazione delle macchie.



**Figura 19.19**

(a) Schema di un fotodensitometro a scansione lineare. (b) Scansione lineare. Il pennello luminoso scorre lungo la direzione di eluizione; questo sistema di rivelazione è inadatto se il percorso delle macchie ha subito per qualsiasi motivo una distorsione durante l'eluizione, a meno di procedere a una scansione lineare. (c) Scansione a zig zag. Il pennello luminoso scorre in modo sincrono sia lungo la direzione di eluizione ( $y$ ) sia in direzione perpendicolare a questa ( $x$ ). Il movimento lungo l'asse  $x$  viene calibrato per ottenere anche un controllo del bianco nelle posizioni 1 e 2. (d) Tipico tracciato densitometrico.

In linea di principio, negli strumenti più semplici si fa passare sulla lastrina un pennello luminoso lungo la direzione di eluizione. Se la lastrina è trasparente, si misura l'assorbimento da parte delle macchie via via che il pennello le incontra nel suo movimento; se la lastrina è opaca, si misura invece la riflettanza diffusa. In alternativa si misura l'emissione di fluorescenza da parte delle macchie eluite.

La sorgente luminosa è una lampada a deuterio (per misure fra 200 e 340 nm) oppure una lampada alogena (da 340 a 700 nm) o una lampada a vapori di mercurio (per misure di fluorescenza).<sup>23</sup>

Il raggio uscente dalla sorgente viene collimato su un monocromatore con cui si seleziona la lunghezza d'onda del pennello di luce; il monocromatore, collegato a un sistema spettrofotometrico, consente anche di effettuare una scansione spettrale su una singola macchia per registrarne lo spettro di assorbimento in trasmissione (lastrina trasparente) o in riflettanza (lastrina opaca), oppure per registrare lo spettro di emissione della fluorescenza emessa dalle macchie.

<sup>23</sup> Gli strumenti più sofisticati contengono tutte e tre le lampade, che possono essere controllate tramite software.

Il raggio viene poi inviato su uno specchio semitrasparente che lo convoglia in parte su un fotomoltiplicatore di riferimento e in parte sulla lastrina. Se la lastrina è opaca, il **rivelatore di riflettanza** riceve la radiazione diffusa oppure la radiazione fluorescente che proviene da questa; se invece la lastrina è trasparente, il **rivelatore di trasmittanza** riceve la radiazione trasmessa.

Per registrare il cromatogramma, la lastrina viene fatta scorrere lungo la direzione di eluizione, mentre un microprocessore elabora i segnali in arrivo dai rivelatori. Nel caso di misure in trasmissione il segnale viene presentato in termini di variazione di assorbanza; nel caso di misure in fluorescenza, in termini di variazione di intensità luminosa. Le misure in riflettanza vengono invece fornite dalla funzione di Kubelka Munk (v. Capitolo 11, paragrafo 11.5).

Gli strumenti più sofisticati consentono di effettuare sia una scansione lineare del pennello luminoso, lungo la direzione di eluizione, sia una scansione a zig zag per compensare le inevitabili deviazioni laterali delle macchie (►fig. 19.19*b* e *c*).

**Analizzatori di immagine.** Questi strumenti consentono di riprodurre su video un'immagine fedele della lastrina e quindi di effettuare misure sulle singole macchie (area, intensità, colore e così via). Sono particolarmente utili per la lettura di cromatogrammi bidimensionali. I costi, però, sono relativamente alti e le prestazioni, in termini di sensibilità e intervallo di linearità, sono inferiori ai fotodensitometri.