

19.5 VARIANTI DELLA TLC

19.5.1 TLC a zona di concentrazione

Sono in vendita lastre pronte per l'uso con due strati separati da una netta demarcazione:

- lo strato di concentrazione, largo 2,5-3 cm, che ha uno spessore di 0,15 mm ed è costituito da Kieselguhr oppure da silice sintetica a granulometria elevata;
- lo strato cromatografico vero e proprio che ha uno spessore di 0,25 mm ed è costituito da gel di silice.

La semina viene effettuata nella zona di concentrazione, che è praticamente inerte verso qualunque sostanza. La miscela in esame, indipendentemente dalla forma, dalla posizione e dall'estensione della macchia di semina, migra verso lo strato di gel di silice e arriva alla linea di separazione fra i due strati formando una linea sottile (►fig. 19.20). Questa tecnica presenta alcuni vantaggi:

- rapidità di esecuzione – le macchie possono essere seminate senza particolare accuratezza e i campioni diluiti possono essere seminati velocemente a più riprese senza bisogno di far evaporare il solvente fra un'applicazione e la successiva;
- migliore separazione – in quanto le linee hanno una forma più regolare, che non dipende affatto dal modo di semina.

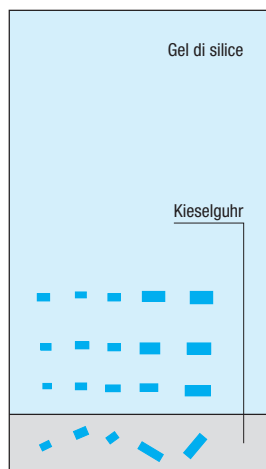


Figura 19.20
TLC a zona di concentrazione; la zona di concentrazione è in Kieselguhr, quella cromatografica vera e propria in gel di silice.

19.5.2 TLC a elevate prestazioni, HPTLC, nanocromatografia

Sono disponibili in commercio lastre con uno strato più sottile di quello standard e con un grado di uniformità molto elevato; lo spessore è di circa 100-250 μm e il diametro delle particelle è compreso fra 2 e 10 μm . Queste lastre sono più efficienti di quelle usate normalmente e consentono l'applicazione di volumi di campione molto piccoli; ciò consente la separazione di quantità molto piccole (dell'ordine dei nanogrammi) in tempi molto brevi.

La tecnica è detta TLC a elevate prestazioni (*High Performance TLC*, HPTLC) o anche nanocromatografia.

I volumi ottimali per HPTLC sono compresi fra 10 e 100 nL e perciò si devono usare capillari speciali per la semina. È cruciale che le macchie, nel punto di applicazione, siano estremamente compatte.

Come materiale adsorbente si usano in genere gel di silice/Kieselguhr e cellulosa microcristallina, ma anche fasi legate (RP-8, RP-18, CN, diolo NH_2); i risultati ottenuti su questi materiali possono essere usati anche per mettere a punto e ottimizzare le stesse analisi in HPLC su colonna a fase inversa.

19.5.3 TLC a flusso forzato

La TLC a flusso forzato (*forced-flow TLC*) o TLC ad alta pressione (*Over Pressure TLC*, OPTLC) è probabilmente la più significativa evoluzione della tecnica su strato. I numerosi vantaggi che essa offre la rendono talvolta competitiva con la corrispondente tecnica su colonna, ossia la HPLC.

Il flusso forzato viene ottenuto spingendo la fase mobile lungo lo strato sottile

mediante un adeguato sistema di pompaggio. Lo strato sottile, che può essere costituito da una lastrina classica o da uno strato HPTLC, è ricoperto da una membrana elastica, mentre tre lati della lastrina sono sigillati. L'eluente viene pompato alla base della lastrina, dove è incisa una lunga scanalatura. I vantaggi che ne derivano sono numerosi:

- l'altezza del piatto teorico è da 10 a 100 volte più piccola del consueto.
- possibilità di effettuare la separazione in un ambiente completamente chiuso, che quindi non può essere influenzato dal grado di condizionamento della camera di eluizione;
- tempi di eluizione molto brevi, per cui si possono usare fasi stazionarie con granulometria più fine, per aumentare l'efficienza, senza dilatare eccessivamente i tempi di lavoro;
- possibilità di controllare il flusso di eluente. Questo consente sia una maggiore riproducibilità della separazione, sia di allungare la corsa dei composti da separare, aumentando così selettività ed efficienza²⁴;
- possibilità di realizzare gradienti di eluizione oppure eluizioni multiple;
- possibilità di usare eluenti che bagnino in misura anche molto scarsa la fase stazionaria, in quanto il loro flusso dipende dalla pressione e non dalla capillarità;
- possibilità di effettuare separazioni preparative in tempi molto brevi.

In una variante recente di questa tecnica, l'eluente viene pompato al centro di uno strato circolare orizzontale che viene poi centrifugato (*Centrifugal Layer Chromatography*, CLC). Con questa tecnica si può realizzare anche un sistema di alimentazione continuo del campione per ottenere separazioni preparative recuperando le frazioni all'uscita dello strato (►fig. 19.21).

²⁴ L'efficienza può arrivare fino a 31000 piatti teorici, contro i 5000 tipici della eluizione convenzionale, e soprattutto non dipende dalla distanza percorsa dalla macchia.

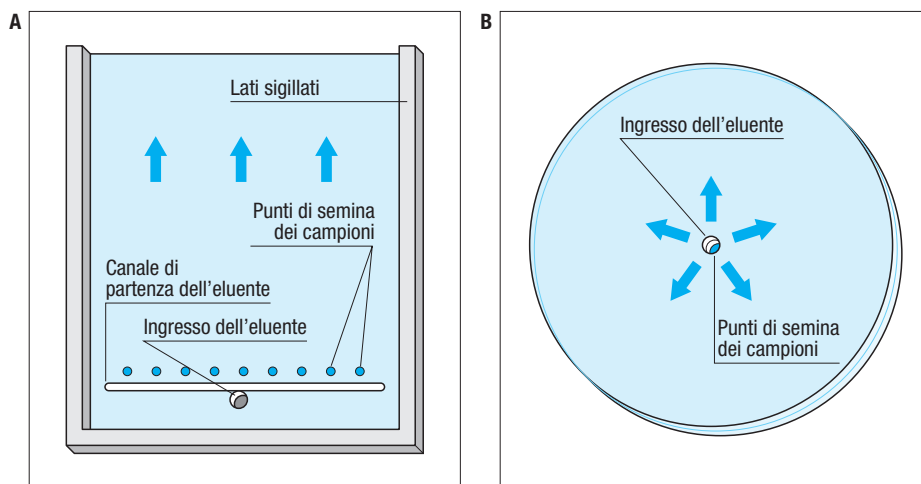


Figura 19.21

Schema di funzionamento di sistemi a flusso forzato: (a) OPTLC e (b) HPPLC. Lo strato sottile è ricoperto da una membrana elastica; l'eluente viene pompato alla base della lastrina attraverso una fenditura.

Un'ulteriore variante delle precedenti tecniche è la cromatografia su strato circolare ad elevata pressione (*High Pressure Planar Liquid Chromatography*, HPPLC), in cui il campione viene depositato nel centro di una piastrina circolare e nello stesso punto viene poi pompato l'eluente. Si uniscono così le elevate prestazioni dovute all'eluizione sotto pressione con quelle dovute all'eluizione circolare (migliore selettività ed efficienza).

La tabella 19.6 mostra un interessante confronto fra le prestazioni della TLC convenzionale, ancora largamente usata, e la TLC nelle sue varianti più moderne.

■ 19.5.4 TLC a sviluppo multiplo programmato o automatizzato

La TLC a sviluppo multiplo programmato (*Programmed Multiple Development TLC*, PMD-TLC) o automatizzato (*Automated Multiple Development TLC*, AMD-TLC) è una tecnica largamente adottata quando si vuole aumentare la risoluzione. In pratica si effettua una classica cromatografia su strato e poi la si ripete nella stessa direzione, dopo aver essiccato lo strato, con lo stesso eluente oppure con uno diverso.

Le varie eluizioni possono essere realizzate facendo correre l'eluente sempre fino alla fine della lastrina, oppure a distanze minori, oppure ancora solo per tempi stabiliti. Con una strategia di eluizione accorta si possono ottenere macchie ben separate e compatte (di forma ellittica, invece che circolare). Risultati ancora migliori si ottengono adattando questa tecnica alla cromatografia bidimensionale.

■ 19.5.5 Cromatografia su carta

Invece dello strato sottile si può usare, come fase stazionaria, un sottile foglio di carta (cellulosa a fibre corte), che contiene sempre una certa quantità di acqua sotto forma di umidità, o su cui viene fatto adsorbire un solvente apolare. Si realizza così la cromatografia su carta (*Paper Chromatography*, PC), che può essere effettuata con le diverse

Tabella 19.6

Confronto fra la TLC convenzionale e le varianti più moderne (HPTLC, OPTLC)

Parametro	TLC convenzionale	TLC moderna
Dimensioni della lastra (cm)	5×20	10×10
	20×20	10×20
Spessore dello strato (μm)	100-250	100-200
Dimensioni delle particelle (μm)		
valore medio	15-20	2-15
distribuzione	5-0	più stretta
Volume di campione (μL)	1-5	0,1-0,2
Diametro iniziale della macchia (mm)	3-6	1,0-1,5
Diametro delle macchie dopo la separazione (mm)	6-15	2-6
Distanza di migrazione dell'eluente (mm)	10-15	3-6
Tempo di sviluppo (min)	30-200	3-20
Limiti di rivelabilità con fotodensitometro		
rivelazione in assorbimento (ng)	1-5	0,1-0,5
rivelazione in fluorescenza (pg)	50-100	5-10
Numero di campioni per lastrina	10	18-36*

* Dipende dalla possibilità di eseguire due sviluppi simultanei da due lati opposti.

[Fonte: C.F. Poole, S.K. Poole, «Modern Thin Layer Chromatography», *Analytical Chem.*, cit.]

tecniche (ascendente, discendente e così via) usate in TLC. La difficoltà di preparare carte sufficientemente omogenee comporta i seguenti svantaggi rispetto alla TLC:

- minore riproducibilità;
- tempi di lavoro più lunghi;
- efficienza nettamente inferiore, perché sulla carta sono molto più accentuati i fenomeni di diffusione in tutte le direzioni;
- peggiore risoluzione.

A favore della PC stanno invece i costi nettamente inferiori, ma molto spesso ciò non rappresenta un fattore determinante, in considerazione di tutti gli svantaggi. Per questo motivo, anche nei casi in cui la cellulosa risulta la fase stazionaria migliore, si preferisce usare uno strato sottile di cellulosa allo stato microcristallino.