

CROMATOGRAFIA DI SCAMBIO IONICO

1. Considerazioni generali

La cromatografia di **scambio ionico IEC** (Ionic Exchange Chromatography) consente di separare i componenti di una miscela a condizione che si trovino in forma ionica, come cationi con carica (+) o come anioni con carica (-).

Si tratta di una tecnica **LSC** (Liquid Solid Chromatography) o semplicemente **LC** (Liquid Chromatography) in quanto l'eluente è liquido mentre la fase stazionaria è un solido.

Le miscele analizzate devono essere ioniche o ionizzabili e possono essere costituite da sostanze:

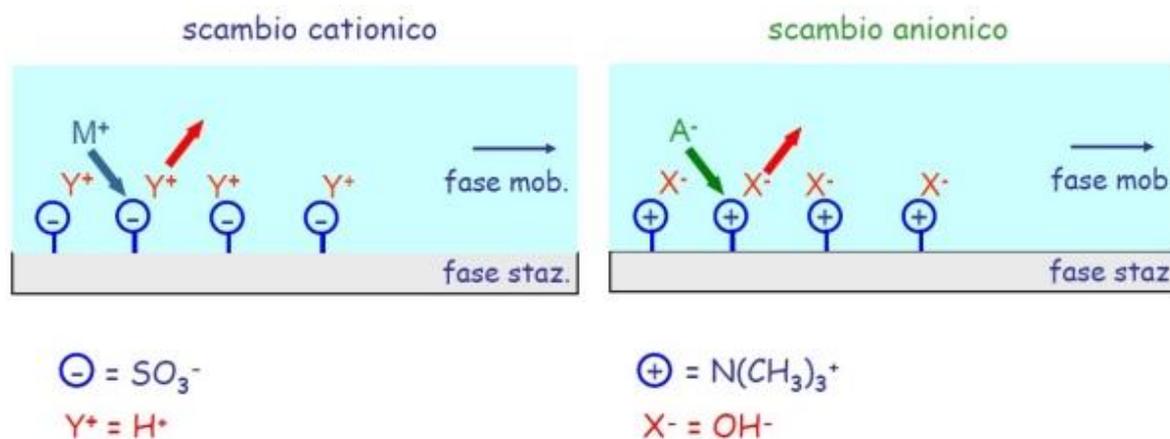
- **inorganiche**: miscele di sali costituiti da cationi metallici e dai loro anioni;
- **organiche**: numerose molecole organiche possiedono delle cariche oppure si possono impartire delle cariche alle molecole, ad esempio utilizzando tamponi per specifici valori di pH, come nell'analisi di miscele di proteine o di aminoacidi.

La fase fissa della IEC è costituita da una **resina scambio-ionica**, un polimero sintetico dotato di gruppi acidi (resina scambio-cationica) o gruppi basici (resina scambio-anionica), in grado di scambiare reversibilmente i propri contro-ioni con gli ioni presenti nel campione analitico.

Vi sono due diverse possibilità:

- **resina cationica (acida)**: scambia i propri contro-ioni positivi, di solito H^+ , con i cationi del campione analizzato;
- **resina anionica (basica)**: scambia i propri contro-ioni negativi, di solito OH^- , con gli anioni del campione analizzato.

I contro-ioni che vengono scambiati vengono anche definiti come ioni retro-scambiati dalla resina.



La separazione degli analiti costituenti il campione è tipica di tutti i metodi cromatografici: basata sulla **diversa affinità** con le due fasi presenti nel sistema cromatografico.

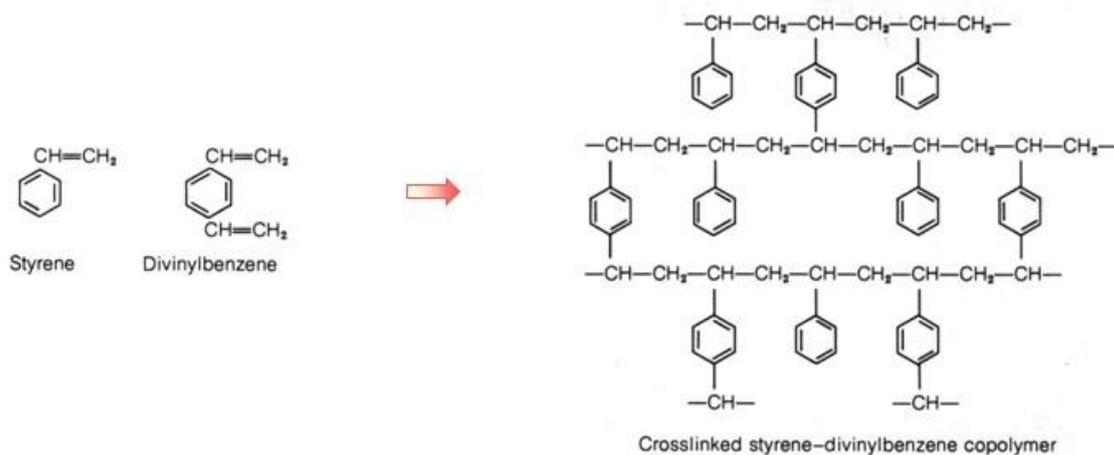
Il campione viene trascinato dall'eluente (fase mobile) a contatto con la resina (fase fissa) all'interno del sistema cromatografico.

Gli ioni che vengono scambiati in modo più attivo e quindi trattenuti maggiormente sulla resina verranno rallentati e quindi, avendo una maggiore affinità per la fase fissa, usciranno dal sistema in tempi successivi rispetto agli ioni che vengono scambiati in modo meno efficace, cioè trattenuti meno sulla resina e quindi avranno minore affinità per la fase fissa, uscendo per primi.

2. Fase fissa

In genere si utilizzano come resine scambio-ioniche dei **copolimeri stirene-divinilbenzene** (DVB) con circa l'8% di DVB: si ottengono catene reticolate con anelli aromatici che fanno da ponte tra catene diverse.

Tali polimeri vengono in seguito modificati in seguito all'introduzione di gruppi scambio-ionici acidi o basici, inseriti negli anelli aromatici laterali alla catena, grazie a specifiche reazioni di sostituzione elettrofila aromatica, come ad esempio reazioni di solfonazione per l'introduzione di gruppi solfonici acidi $-SO_3H$



Si distinguono vari tipi di resine scambio-ioniche, a seconda dei gruppi introdotti:

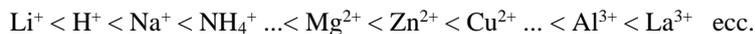
- **gruppi acidi: forti** (SCX - Strong Cation eXchanger) con come gruppi solfonici $-\text{SO}_3\text{H}^+$ o **deboli** (WCX - Weak Cation eXchanger) come carbossilato $-\text{COO}^-$ o fenato $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}^-$
- **gruppi basici: forti** (SAX - Strong Anion eXchanger) con atomi di azoto quaternario $-\text{N}(\text{CH}_3)_3^+\text{OH}^-$ o **deboli** (WAX - Weak Anion eXchanger) con gruppi amminici terziari $-\text{NR}_2$ o secondari $-\text{NHR}$

La scelta di una fase di scambio debole o forte dipende dal campione analizzato e dal pH di lavoro:

Tipo	pH di lavoro	Esempi di applicazione
Scambiatore cationico forte	1-14	Aminoacidi, separazioni cationi metallici
Scambiatore cationico debole	5-14	Metalli transizione, basi organiche, proteine e polipeptidi
Scambiatore anionico forte	1-12	Alcaloidi, acidi grassi, proteine
Scambiatore anionico debole	1-9	Acidi organici, aminoacidi

Prima di iniziare l'analisi è necessario **lavare la fase fissa** con soluzioni di acidi forti (per resine scambio-cationiche) o di basi forti (per resine scambio-anioniche), in modo da ricaricare completamente i gruppi acidi o basici della resina e da eliminare gli eventuali ioni ancora trattenuti dall'analisi precedente.

L'**ordine di eluizione** dei vari ioni, a parità di fase fissa, è in relazione al rapporto carica/massa dello ione idratato; indicativamente si ha la seguente sequenza di eluizione:



3. Fase mobile

L'eluente utilizzato deve tener conto di vari fattori, innanzitutto se le sostanze da separare sono inorganiche oppure organiche (ioniche o ionizzabili). Di solito si usano soluzioni acquose di varie sostanze, tra le quali: acidi o basi forti, tamponi, regolatori di forza ionica, modificatori organici

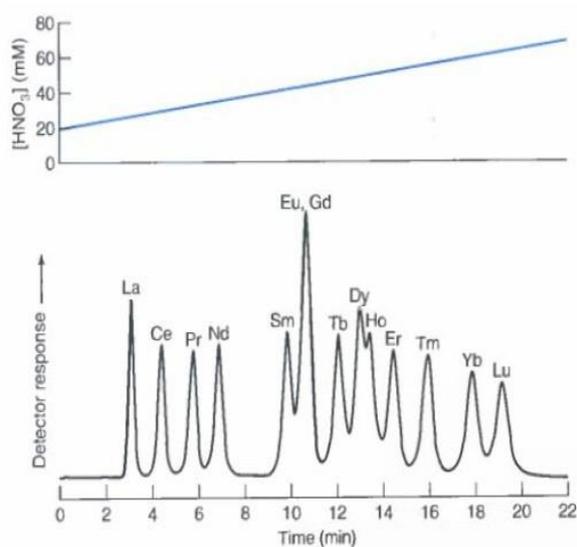
3.1. Controllo del pH

Nella IEC è essenziale il **controllo del pH**, specie se si lavora con elettroliti deboli o anfoteri, come nel caso di varie sostanze organiche. Se ad esempio si vogliono separare miscele di acidi deboli con pK_a intorno a 5, occorrerà tamponare il pH nell'intervallo 6-7 (1 o 2 unità superiore alla pK_a), in modo che gli acidi deboli siano dissociati e che si presentino in forma anionica. Se invece si vogliono separare gli acidi nella loro forma indissociata non si potrà usare la IEC ma altre tecniche cromatografiche, lavorando a pH nettamente inferiore alla loro pK_a .

Occorre considerare inoltre che l'equilibrio tra la fase fissa e la fase mobile, cioè l'equilibrio di scambio ionico, è in realtà un fenomeno molto più complesso. Infatti:

- nella separazione di cationi, utilizzando resine acide, l'eluente dovrà contenere un elettrolita in grado di liberare ioni H^+ , in modo da competere con i cationi scambiati dai gruppi acidi della resina. Si usano soluzioni diluite di acidi forti come HCl o HNO_3 oppure tamponi acidi;
- nella separazione di anioni, utilizzando resine basiche, l'eluente dovrà contenere un elettrolita in grado di liberare OH^- , in modo da competere con gli anioni scambiati dai gruppi basici della resina. Si usano soluzioni diluite di basi più o meno forti, come Na_2CO_3 o NaHCO_3 o tamponi basici.

La tecnica più comune è la **separazione isocratica** a composizione costante di eluente. Si usano miscele di eluenti con specifici additivi, anche per impartire una adatta forza ionica. In questo si utilizza un singolo tampone scelto al pH più opportuno per ottimizzare la separazione dei componenti della miscela. E' possibile anche operare in **gradiente di eluizione** come nella normale tecnica HPLC, variando nel tempo la concentrazione dello ione retro-scambiato dalla resina.



Un caso tipico è quello in cui si lavora in **gradiente di pH**. Ad esempio nella IEC di cationi si aumenta nel tempo, in modo lineare o meno, la quantità di un acido forte come HNO₃ addizionata all'eluente, in modo da competere in modo sempre maggiore con gli H⁺ presenti come contro-ioni della resina acida utilizzata come fase fissa. In questo modo si riesce ad eluire in tempi ragionevoli anche i cationi trattenuti più fortemente dalla resina.

A fianco è mostrato un cromatogramma IEC in cui vengono separati ioni dei lantanidi mediante un gradiente lineare di eluizione con HNO₃.

3.2. Controllo della forza ionica

La **forza ionica** è definita come:

$$I = \frac{1}{2} \sum (C_i \cdot Z_i^2) \quad C_i: \text{concentrazione ione} \quad Z_i: \text{carica ione}$$

La forza ionica di una soluzione influenza gli equilibri di dissociazione degli elettroliti deboli. Dipende non solo dalle sostanze che variano il pH (acidi/basi forti, tamponi) ma anche da elettroliti come NaNO₃ che non modificano il pH del campione analizzato.

La forza ionica influenza inoltre anche la disponibilità dei siti di scambio ionico presenti sui granuli di resina della fase fissa: se I aumenta, diminuisce la disponibilità di tali siti e quindi aumenta la competizione tra gli ioni retro-scambiati e gli ioni presenti nell'eluente. Tutto ciò modifica, anche in modo sensibile, i risultati ottenuti nella IEC, come ad esempio l'ampiezza delle bande di eluizione.

Nei casi di miscele complesse è possibile migliorare la separazione lavorando in gradiente di eluizione, in particolare utilizzando un **gradiente di forza ionica**, oltre che eventualmente di pH. In questo caso si inizia con un basso valore di I e si aumenta in modo lineare o meno tale valore, allo scopo di eluire in modo selettivo anche gli ioni che si trattengono più a lungo a contatto con la fase fissa.

3.3. Modificatori organici

Gli eluenti utilizzati in IEC sono soluzioni acquose, dato che il pH è essenziale nella separazione. Molte molecole organiche, anche se ionizzate, non sono sufficientemente solubili in acqua, perché la loro parte ionica (idrofila) è troppo piccola rispetto alla parte idrofoba (lipofila), che risulta dominante. Spesso queste molecole, poco solubili nei comuni tamponi acquosi, tendono ad essere adsorbite in modo irreversibile sulla fase fissa e quindi non verrebbero eluite dalla colonna.

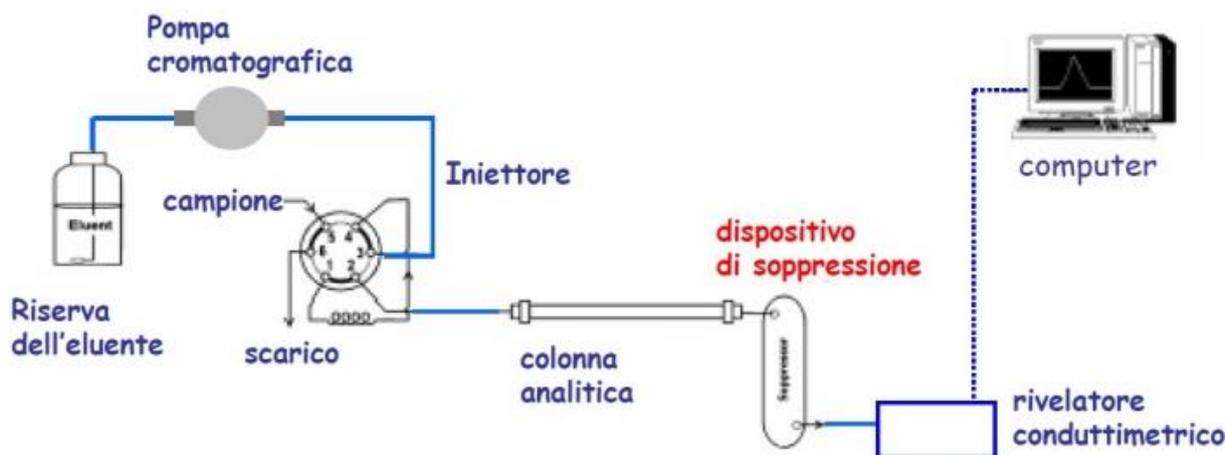
In questi casi all'eluente acquoso vengono addizionate notevoli quantità (anche 30-50%) di **modificatori organici**, come acetonitrile CH₃-CN o metanolo CH₃-OH, che permettono la solubilizzazione di tutte le specie chimiche presenti nel campione da analizzare.

4. Cromatografo ionico

Le IEC può essere effettuata mediante due diversi apparecchi:

- **cromatografia su colonna**, utilizzata sia per scopi analitici che preparativi;
- cromatografia di scambio ionico ad elevate prestazioni **HPIEC** (High Performance Ionic Exchange Chromatography), in pratica una variante dell'HPLC che utilizza resine scambio ioniche come fase stazionaria. La fase stazionaria è presente all'interno di colonne impaccate simili a quelle utilizzate in HPLC.

Lo **schema del cromatografo ionico** è simile a quelle del cromatografo per HPLC:



Si notano: la **pompa** che preleva l'eluente dalla sua riserva e sviluppa l'elevata pressione richiesta, l'**iniettore** con il sistema a multivalvola direzionale, che permette prima la deposizione del campione nel loop di accumulo e quindi il suo trasferimento nella **colonna analitica**, riempita con la fase fissa costituita da un'opportuna resina scambio ionica.

Si nota inoltre un dispositivo non presente nel normale HPLC, detto **dispositivo di soppressione**, utilizzato se il rivelatore è di tipo conduttimetrico. Il dispositivo di soppressione serve ad esaltare la variazione di conducibilità dovuta ai diversi analiti rispetto la conducibilità dell'eluente.

4.1. Rivelatori

Esistono diversi sistemi di rivelazione, che generano un segnale elettrico in corrispondenza all'uscita delle diverse sostanze presenti nel campione analizzato. Singoli apparecchi possono possedere più rivelatori, attivabili in alternanza a seconda del campione.

4.1.1 Rivelatore spettrofotometrico

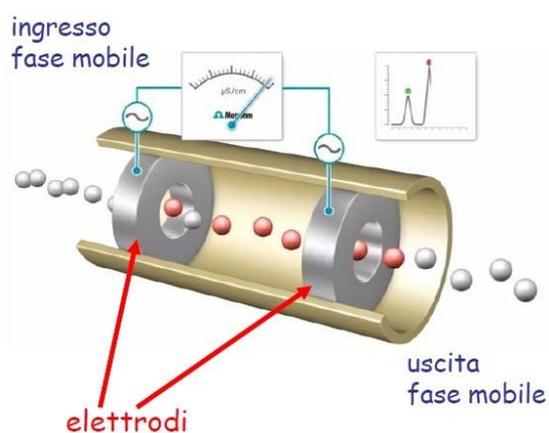
Numerose sostanze organiche assorbono in UV-VIS e anche svariati ioni inorganici, come ad esempio NO_3^- , NO_2^- , Br^- , ecc. Al contrario la maggior parte dei tamponi, eccetto lo ione ftalato, non assorbe in tale zona dello spettro.

Il rivelatore è quindi simile ad uno spettrofotometro, con possibilità di selezionare la λ analitica (rivelatore a lunghezza d'onda variabile), oppure del tipo DAD (Diode Array Detector) cioè a schiera di diodi, con possibilità di registrare l'intero spettro per ogni picco di eluizione del cromatogramma.

A volte è possibile effettuare una derivatizzazione delle sostanze in uscita dalla colonna analitica, in modo da produrre un cromoforo prima del loro arrivo al rivelatore.

4.1.2 Rivelatore conduttimetrico

È il rivelatore più adatto all'analisi IEC, in quanto si separano sostanze ioniche, in grado di variare la conducibilità elettrica dell'eluente.



È costituito da due elettrodi anulari separati da una zona non conduttrice, tra i quali viene applicata una opportuna d.d.p. alternata, in modo da evitare fenomeni di elettrolisi.

Quando nella fase mobile in uscita sono presenti ioni, la conducibilità tra gli elettrodi aumenta e ciò si traduce nell'aumento della corrente elettrica che passa tra gli elettrodi e la conseguente formazione di un picco di eluizione nel cromatogramma.

In questo rivelatore si manifesta un **problema di sensibilità**. L'eluente contiene vari elettroliti (regolatori di forza ionica, tamponi, ecc.) e quindi ha una sua conducibilità elettrica; analizzando campioni diluiti, dell'ordine delle ppm, la variazione di conducibilità registrata è trascurabile rispetto al solo eluente. L'eluente quindi produce un elevato rumore di fondo, che impedisce la corretta rilevazione del segnale prodotto dagli analiti del campione. Per superare questo problema sono state sviluppate varie strategie, tra cui vari sistemi di soppressione.

4.2. IEC con sistemi di soppressione

Questa tecnica è indicata come **SIC** (Suppression Ionic Chromatography). Si utilizzano **sistemi di soppressione ionica** quando il rivelatore è di tipo conduttimetrico. Il dispositivo di soppressione, che si trova tra la colonna analitica e il rivelatore conduttimetrico, ha lo scopo di sopprimere selettivamente gli ioni non analiti presenti nell'eluente, per mezzo di opportune reazioni acido-base, in modo da amplificare la variazione di conducibilità dovuta all'eluizione degli analiti presenti nel campione.

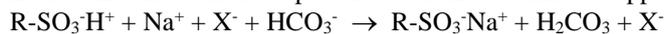
Esistono vari sistemi di soppressione: sistemi a colonna, sistemi a membrana

4.2.1 Sistemi con colonna di soppressione

Dopo la colonna analitica di separazione è posta una colonna scambio-ionica con una resina ad alta capacità, in grado di bloccare gli ioni non analiti presenti nella fase mobile. Vi sono due diverse possibilità.

Analisi di anioni: ad esempio si analizza una miscela di anioni X^- , mediante una resina scambio-anionica; gli ioni vengono eluiti in presenza di un tampone a base di bicarbonato NaHCO_3 . La fase mobile contiene quindi gli ioni: X^- , Na^+ , HCO_3^- . Gli ioni derivanti dal bicarbonato di sodio sono ora indesiderabili, perché aumentano la conducibilità e quindi coprono la conducibilità degli ioni analiti X^- .

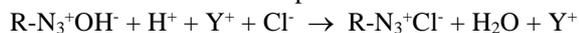
La fase mobile viene fatta passare su di una colonna di soppressione contenente una resina acida forte:



La resina del soppressore trattiene Na^+ e libera H^+ che neutralizza lo ione bicarbonato, formando H_2CO_3 cioè una specie non dissociata. In questo modo si abbatta la conducibilità dell'eluente che può ora passare nel rivelatore

Analisi di cationi: ad esempio si analizza una miscela di cationi Y^+ , mediante una resina scambio-cationica: gli ioni vengono eluiti in presenza di HCl . La fase mobile contiene quindi gli ioni: Y^+ , H^+ , Cl^- . Gli ioni derivanti da HCl sono ora indesiderabili, a causa della loro elevata conducibilità, che copre quella degli ioni analiti Y^+ .

La fase mobile viene fatta passare su di una colonna di soppressione contenente una resina basica forte:



La resina del soppressore trattiene Cl^- e libera OH^- che neutralizza l'eccesso di H^+ formando la specie indissociata H_2O . Anche in questo caso si abbatta la conducibilità dell'eluente che può ora passare nel rivelatore

In entrambi i casi la colonna di soppressione deve essere periodicamente rigenerata, mediante lavaggio prolungato con un acido forte (resina acida) o base forte (resina basica) per ricaricare tutti i siti di scambio ionico.

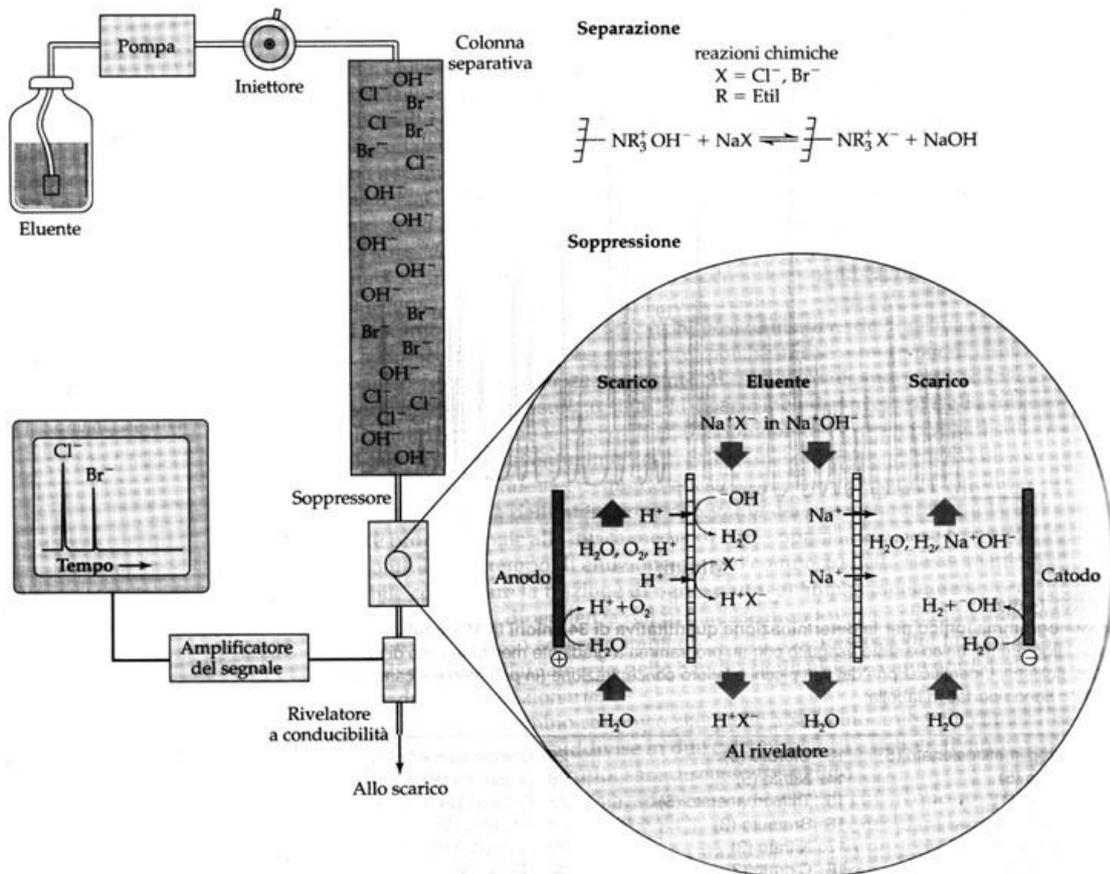
4.2.2 Sistemi continui a membrana

In questo dispositivo non è necessaria una fase di rigenerazione. Si utilizza un sistema con una membrana specifica a seconda dell'analita: se si analizzano anioni la membrana è scambio-cationica, se si analizzano cationi la membrana è scambio-anionica. All'esterno della membrana circola in continuo acqua che, mediante due elettrodi, viene ossidata e ridotta con formazione di H^+ e OH^- .

Nel seguente esempio si considera una miscela analitica formata da anioni analiti X^- sotto forma di sali di sodio NaX in presenza di NaOH come regolatore di pH; tale miscela viene separata su di una resina basica forte in grado di separare gli X^- . All'uscita della colonna analitica la fase mobile contiene gli ioni: X^- , Na^+ , OH^- , essendo costituita formalmente da Na^+X^- in Na^+OH^-

Ovviamente gli ioni dell' NaOH sono ora indesiderabili, in quanto caratterizzati da elevata conducibilità elettrica e quindi in grado di coprire la presenza degli ioni X^- eluiti.

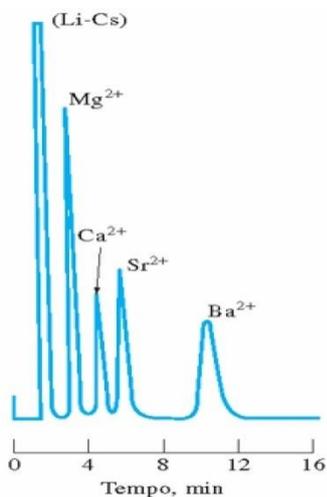
E' necessario procedere alla soppressione degli ioni indesiderati: poiché si analizzano anioni, il soppressore contiene due membrane scambio-cationiche, all'esterno delle quali sono presenti due elettrodi, un anodo (+) ed un catodo (-), tra i quali è applicata una opportuna d.d.p. All'interno delle membrane passa l'eluente proveniente dalla colonna analitica, all'esterno delle membrane viene inviato un flusso continuo di acqua pura, allo scopo di far avvenire le seguenti reazioni di scarica:



- all'anodo si ha l'ossidazione dell'acqua: $2H_2O \rightarrow 4H^+ + O_2 + 4e^-$ Gli OH^- dell'eluente vengono respinti dalla membrana mentre gli H^+ prodotti dall'ossidazione attraversano la membrana scambio-cationica e si combinano sia con OH^- formando acqua, sia con X^- formando H^+X^-
 - al catodo vengono richiamati gli ioni Na^+ che attraversano la membrana; inoltre si ha la riduzione dell'acqua: $2H_2O + 2e^- \rightarrow H_2 + 2OH^-$ ed infine gli OH^- prodotti si combinano con gli Na^+ formando Na^+OH^-
- All'uscita del sistema di soppressione la fase mobile che va al rivelatore è costituita solo da H^+X^- e quindi la sua conducibilità è nettamente diminuita, con un parallelo aumento della sensibilità verso gli X^-

5. Applicazioni della IEC

Sono numerose in svariati campi; di seguito sono riportati alcuni **esempi**:

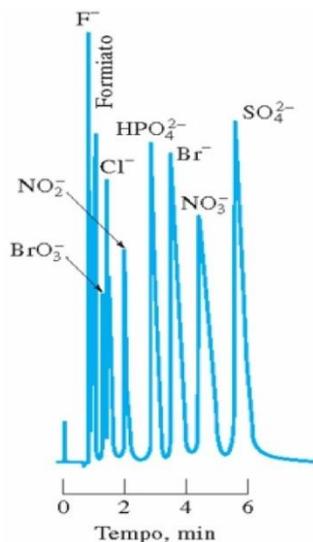


Separazione di cationi inorganici

Mg^{2+} e Ca^{2+} : 3 ppm
 Sr^{2+} : 10 ppm
 Ba^{2+} : 25 ppm

Eluente: soluzione acquosa di benzidiammina cloridrato 0,025 M e HCl 0,0025 M su resina scambio cationica

Come si vede i picchi di Li^+ e Cs^+ non sono risolti nelle condizioni di lavoro utilizzate

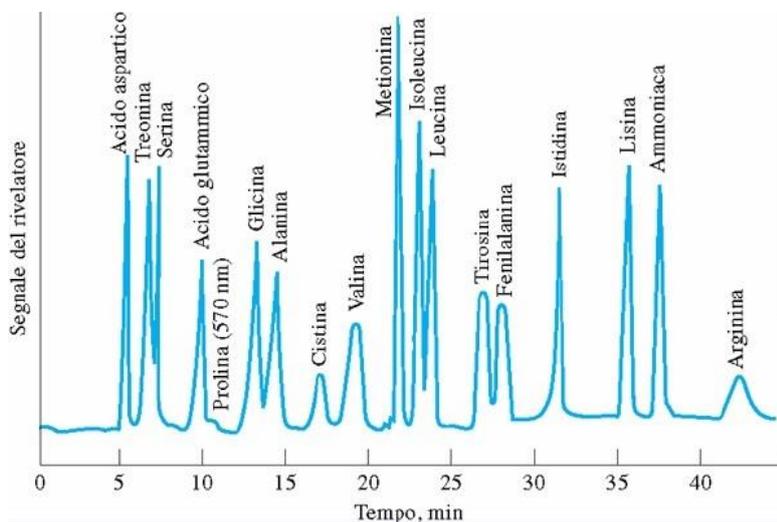


Separazione di anioni

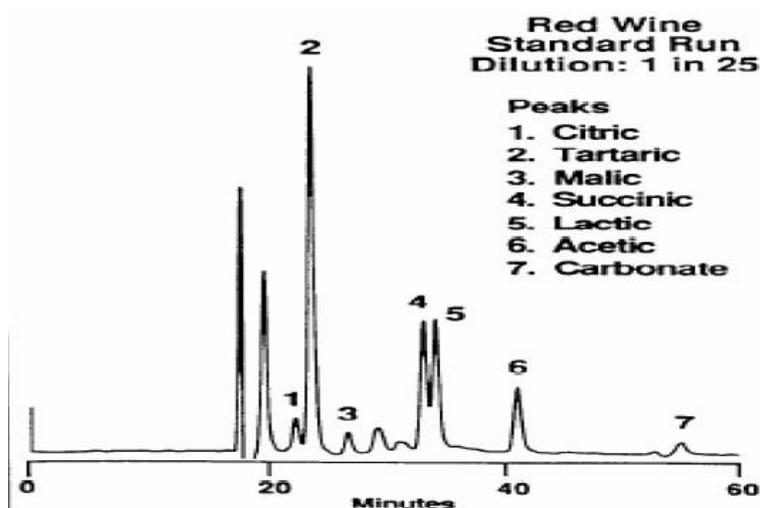
F⁻: 3 ppm HCOO⁻: 8 ppm BrO₃⁻: 10 ppm
 Cl⁻: 4 ppm NO₂⁻: 10 ppm HPO₄²⁻: 30 ppm
 Br⁻: 30 ppm NO₃⁻: 30 ppm SO₄²⁻: 25 ppm

Eluente: soluzione acquosa di NaHCO₃ 0,0028 M e Na₂CO₃ 0,023 M su resina basica

Le concentrazioni di tampone nell'eluente sono molto basse per evitare una eccessiva concentrazione di ioni e quindi una conducibilità elettrica troppo alta nella fase mobile



Separazione di aminoacidi



Separazione di anioni degli acidi del vino