

UNA TAPPA FONDAMENTALE NELLA STORIA DELLA CROMATOGRAFIA

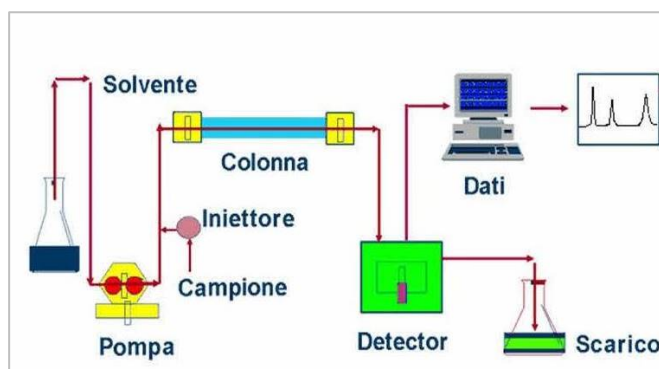
Marco Taddia

Dipartimento di Chimica "G. Ciamician"

Università di Bologna

marco.taddia@unibo.it

Secondo l'opinione corrente, l'HPLC è nata nel 1966. Assegnare una data precisa a un evento del genere può essere una semplificazione della realtà ma stavolta lo è meno del solito, purché si aggiunga che il primo lavoro di carattere fondamentale fu pubblicato l'anno seguente.



Ai giorni nostri, e non solo per gli specialisti del settore, un'ipotetica graduatoria delle tecniche analitiche più diffuse, vedrebbe la cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC - High Performance Liquid Chromatography) in posizione dominante rispetto a tutte le altre. I più moderni testi didattici riflettono la situazione e riservano la dovuta attenzione anche alle fasi operative, con l'evidente preoccupazione che gli allievi si trovino a loro agio nella pratica di laboratorio [1]. La storia di questa tecnica separativa è molto interessante ed è stata raccontata in numerosi articoli, specialmente ad opera di Ettore [2]. Come in altri casi, gli autori che hanno avuto un ruolo significativo nello sviluppo dell'HPLC sono numerosi ma i contributi che si possono considerare decisivi sono forse una decina. Di questi, tre sono in cima alle preferenze di chi scrive.

Spicca innanzitutto l'articolo a firma A.J.P. Martin (1910-2002) e R.L.M. Synge (1914-1994), pubblicato sul *Biochemical Journal* nel dicembre 1941 [3]. Il sommario contiene un paio di affermazioni che segneranno la storia della cromatografia. Non per nulla, ai due (Fig. 1) venne assegnato il Nobel per la chimica nel 1952.



Fig. 1 - A.J.P. Martin (1910-2002) e R.L.M. Synge (1914-1994)

All'inizio del sommario si dice che l'articolo descrive una nuova forma di cromatografia che non dipende dall'adsorbimento su una fase solida ma dalla partizione dei soluti fra due fasi liquide.

La seconda non è di minore importanza in quanto si precisa che è stata sviluppata una teoria generale della cromatografia, basata sul concetto di “piatto teorico”, che la collega alla distillazione frazionata e all'estrazione. Martin e Synge non si limitarono però agli aspetti teorici, infatti il lavoro descrive l'applicazione della nuova tecnica all'analisi di idrolizzati proteici per la determinazione di aminoacidi.

Se il contributo di Martin e Synge apriva, con la cromatografia di partizione fra due fasi liquide, una strada assai promettente nel campo della scienza delle separazioni, restava ancora un lungo cammino da compiere prima di avvicinare le prestazioni della cromatografia liquida a quella che ormai da anni, con risultati sempre migliori, utilizzava come fase mobile un gas (GC). Si trattava essenzialmente di limitazioni dal punto di vista strumentale dovute all'impiego di supporti a granulometria molto fine.

Trascorsero circa venticinque anni prima che gli ostacoli venissero superati e il traguardo fu tagliato da C.G. Horváth e S.R. Lipsky che nel 1966, con un famoso articolo su *Nature* [4], descrissero la separazione di alcuni composti tiroidei e di costituenti degli acidi nucleici.

La separazione fu realizzata con un apparato strumentale che richiama i moderni cromatografi per HPLC.

L'articolo segna, per la comunità scientifica, la data convenzionale della nascita dell'HPLC, tant'è che l'anno scorso se ne è celebrato il cinquantenario [5].

Detto ciò, non si può dimenticare che il lavoro ritenuto fondamentale fu pubblicato l'anno successivo su *Analytical Chemistry*, dagli stessi autori, cui si aggiunse B.A. Preiss [6]. Esso si apre con una osservazione e una dichiarazione d'intenti destinata anch'essa alla storia della scienza. Rileggiamola insieme: “È ancora da inventare una tecnica per la separazione di sostanze non volatili paragonabile alla gascromatografia, in termini di velocità, efficienza, sensibilità e versatilità. Questo studio è stato intrapreso per cercare di sviluppare un sistema di cromatografia liquida che potrebbe avvicinarsi all'obiettivo”. Subito dopo gli autori precisano che l'apparato, descritto nel lavoro, lo hanno applicato all'analisi di *nucleosidi* con gruppi fosfato. Scorrendo il lavoro, nella penultima pagina, troviamo infatti una bella separazione di ribonucleosidi mono-, di-, e trifosfato, che precede un esempio di applicazione a estratti cellulari da fegato e cervello di topo.

Per mettere in risalto i vantaggi della tecnica sviluppata, gli autori non mancano di confrontarla con quelle già a disposizione dei biochimici. Affermano che l'analisi tradizionale di idrolizzati degli acidi nucleici, effettuata mediante separazione su colonna, con resina fortemente basica, richiede come minimo 20 ore di tempo, la colonna non è riutilizzabile ed è richiesta una consistente quantità di campione. Visto che con la nuova tecnica occorre meno di 1 ora, il vantaggio è lampante.

L'articolo non è meramente applicativo come quello già citato [4]. Dopo una introduzione in cui vengono richiamati gli importanti contributi di autori i cui nomi finiranno meritatamente sui manuali didattici, come J.J. Van Deemter (1918-2004), M.J.E. Golay (1902-1989), J.C. Giddings (1930-1996), si dà conto degli esperimenti effettuati in termini di:

- a) allargamento della banda in colonne capillari prive di fase stazionaria;
- b) prestazioni ottenute con colonne a particelle pellicolari;
- c) fattori che influenzano la ritenzione.

Non manca uno schema a blocchi dell'apparato strumentale, con alcune variazioni rispetto a quello riportato l'anno precedente [4], accompagnato da una esauriente descrizione della preparazione delle colonne. Quelle a scambio anionico, ad esempio, erano costituite da perline di vetro di ca. 50 μm , ricoperte di resine polistireniche funzionalizzate mediante clorometilazione e reazione con dimetilbenzilammina.

La completezza del lavoro, l'equilibrio fra parte teorica ed applicativa e, non ultima, la chiarezza ed eleganza espositiva ne fa, probabilmente uno dei migliori lavori di chimica analitica del Novecento.

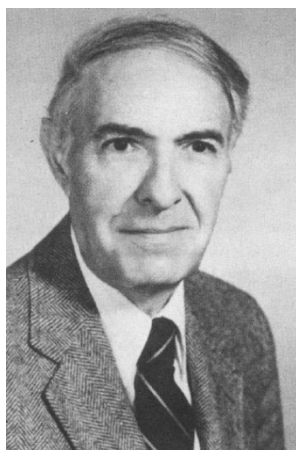
Pagine di storia



A questo punto, non può mancare qualche notizia sugli autori [2]. Csaba Horváth (1930-2004) (Fig. 2), si era laureato in ingegneria chimica nel 1952 a Budapest. Lasciò l'Ungheria alla fine del 1956 per trasferirsi in Germania. Dopo un'esperienza di lavoro come ingegnere di processo, tornò all'Università per conseguire il Ph.D. e si aggregò al gruppo di Halász, a Francoforte, per svolgere ricerche in campo gascromatografico. Dopo il Ph.D. (1963) raggiunse l'Harvard Medical School di Cambridge (Mass.).

Fig. 2 - C. Horváth (1930-2004)

Iniziò a svolgere ricerche in campo biochimico e avvertì presto l'esigenza di sviluppare un'apparecchiatura capace di compiere la separazione di suo interesse. Purtroppo, ad Harvard non condividevano tale aspirazione e così si trasferì presso la Yale



Medical School dove "Sandy" Lipsky (1924-1986) (Fig. 3), si trovava dal 1952. Questi aveva realizzato importanti applicazioni della GC e in quegli anni cercava collaboratori per sviluppare la cromatografia liquida dal punto di vista strumentale. Horváth s'impegnò subito nelle ricerche e nell'estate del 1965 il primo cromatografo HPLC fu pronto.

Fig. 3 - S.R. Lipsky (1924-1986)

Il terzo autore dell'articolo del 1967 è B.A. (Ben) Press, il "giovane" del terzetto, esperto dell'analisi di acidi nucleici, di cui non si hanno molte notizie.

Al termine di questo articolo una curiosità. Prima che Horváth raggiungesse Lipsky a Yale, quest'ultimo oltre ad essere piuttosto indaffarato nel tentare di separare le miscele che gli fornivano i colleghi biochimici, era stato scelto dalla NASA come principale analista delle sostanze organiche eventualmente reperite sulla Luna. Questo incarico gli permise di formare il Gruppo di cui avrebbe fatto parte anche Horváth e portò alla nascita dell'HPLC.

Ancora oggi qualcuno si domanda a cosa sia servito andare sulla Luna. L'esempio citato è solo uno dei tanti a sostegno del fatto che ricerche costose, apparentemente "inutili", possono produrre risultati tali in campo scientifico-tecnologico da giustificare ampiamente i mezzi impegnati.

BIBLIOGRAFIA

¹D.C. Harris, C.A. Lucy, Quantitative Chemical Analysis, 9th Ed., Freeman and C., New York, 2015, 667.

²L.S. Ettre, *LCGC North America*, 2005, **23**(5), 486.

³A.J.P. Martin, R.L.M. Synge, *Biochemical J.*, 1941, **35**(12), 1358.

⁴C.G. Horvath, S.R. Lipsky, *Nature*, 1966, **211**(5050), 748.

⁵C.H. Arnaud, *C&EN/CEN.ACS.ORG*, 2016, June 13, 29.

⁶C.G. Horvath, B.A. Preiss, S.R. Lipsky, *Analyt. Chem.*, 1967, **39**(12), 1422.