

Industrializzazione e regolamentazione



di prodotti biotecnologici

❖ **Obiettivi formativi**

Prospettiva industriale relativa ai requisiti di sviluppo e produzione di prodotti biotecnologici per la cura e la prevenzione di malattie, sia dal punto di vista tecnico che normativo.

❖ **Docente**

PhD Gabriele Meli

❖ **FOCUS**

Industrializzazione di processo

❖ **Orario lezioni**

Martedì e Mercoledì 17-19

❖ **Modalità di esame**

Scritto

❖ **Contatto preferenziale**

gabriele.meli78@gmail.com

Questo corso contiene informazioni a scopo didattico, non correlate in alcun modo a dati rilevanti per Bracco Imaging S.p.A. e fa riferimento alla formazione personale ed all'esperienza professionale secondo il mio punto di vista.

GABRIELE MELI

HPLC: High Performance Liquid Chromatography

Il cromatografo per HPLC

- può assumere varie configurazioni secondo che sia destinato a funzionare in condizioni isocratiche oppure in gradiente di eluizione;
- In quest'ultimo caso la miscelazione può avvenire prima (bassa pressione) oppure dopo (alta pressione) dell'ingresso nella pompa

HPLC: High Performance Liquid Chromatography



Riserva della fase mobile

- Sono contenitori di materiale inerte, per non inquinare il solvente, con una capacità tale da assicurare l'esecuzione di un certo numero di analisi;
- I materiali usati sono in genere: vetro, acciaio inox o PTFE. La capacità in genere non supera mai i 2 L per la chimica analitica (con flussi medi di 1-2 mL/min e durata dell'analisi di pochi minuti), mentre possono essere necessari volumi maggiori per la preparativa;
- Il solvente passa al Cromatografo attraverso un piccolo tubicino che contiene in genere un filtro in vetro sinterizzato per trattenere eventuali impurità grossolane.

HPLC: High Performance Liquid Chromatography

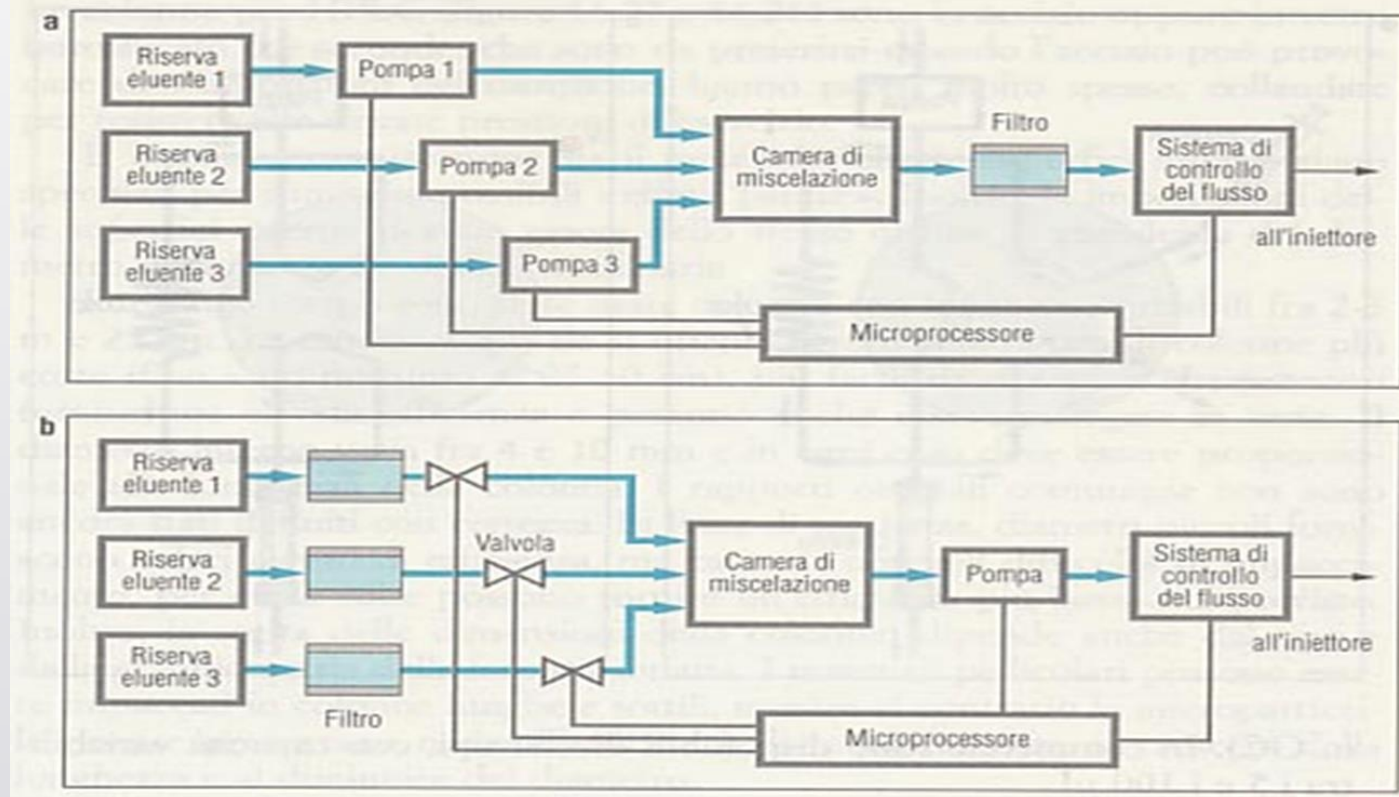
Pompe

- Fornire elevate pressioni in ingresso (fino a 400 atm, cioè circa 5800 psi);
- Mantenere il flusso di eluente il più costante e riproducibile possibile;
- Consentire un'ampia gamma di flussi (da 0,5 a 10 mL/min);
- Avere un volume morto molto piccolo (minima variazione di composizione dell'eluente in determinazioni in gradiente);
- Avere un adeguato sistema di smorzamento delle pulsazioni;
- Avere una notevole inerzia chimica; avere elevata autonomia;
- Consentire rapide operazioni di ricambio della fase mobile e di pulizia;

HPLC: High Performance Liquid Chromatography

Filtri

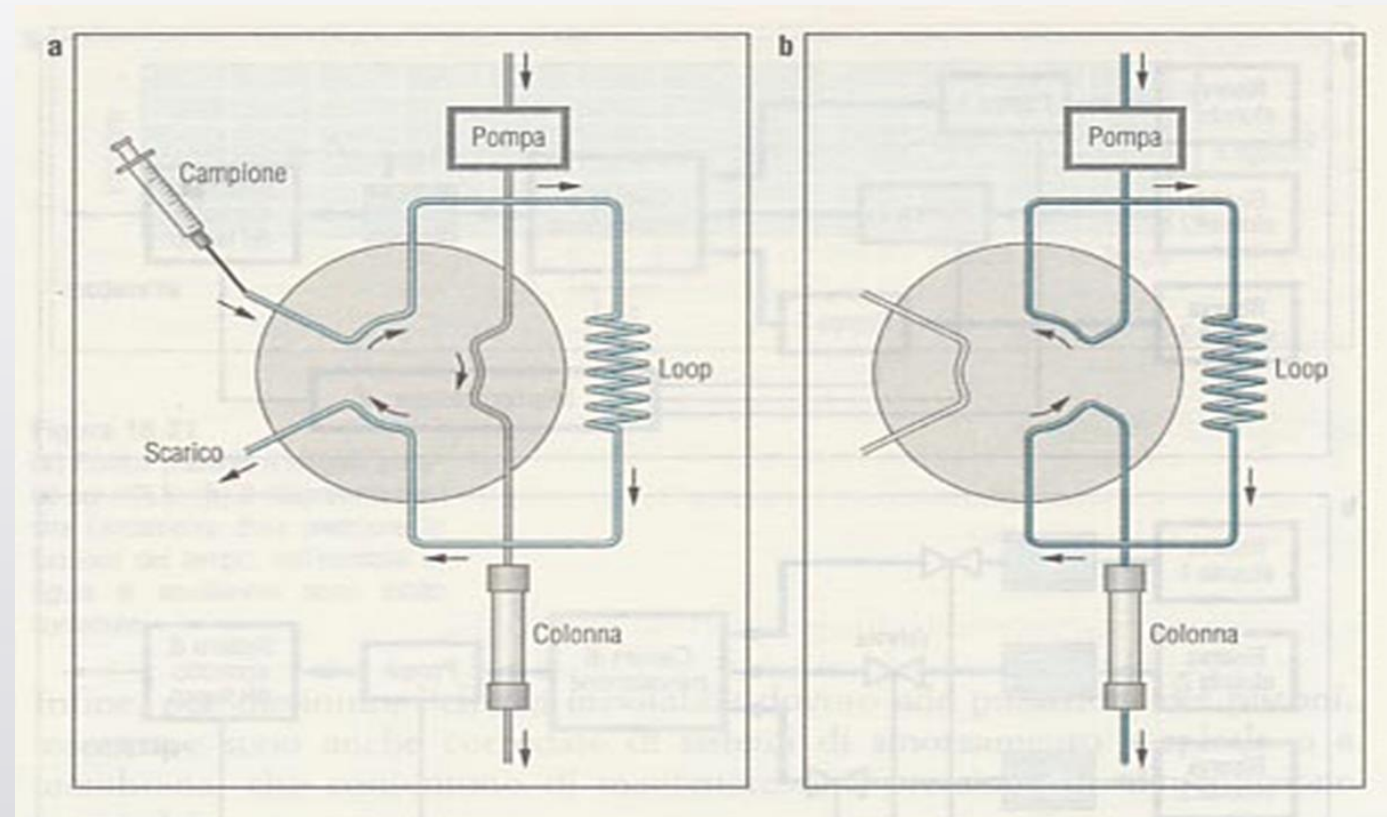
- Usati per impedire che granelli di materiale di qualunque tipo entrino in colonna si usa un sistema di filtri (diametro pori di 5-10 μ m) a monte dell'iniettore:



HPLC: High Performance Liquid Chromatography

Sistema di iniezione

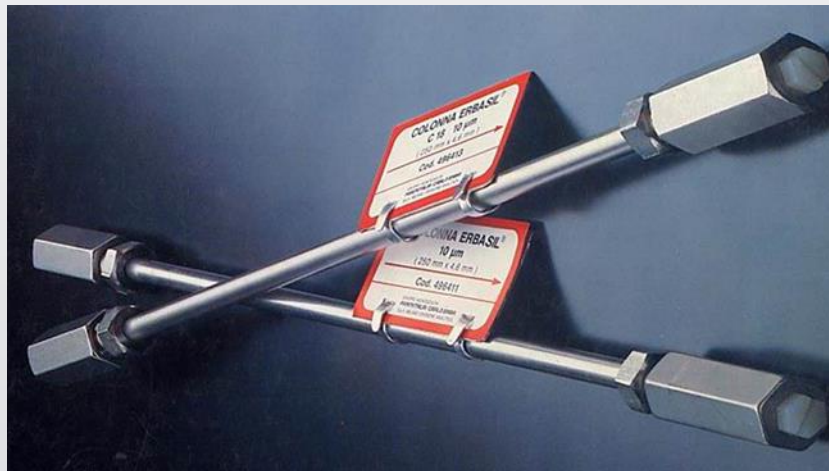
- Il campione può essere inserito mediante una microsiringa (sistema ormai abbandonato) o mediante una apposita valvola azionata manualmente o meccanicamente:



HPLC: High Performance Liquid Chromatography

Colonne

- Le colonne sono in acciaio o in vetro borosilicato con pareti molto spesse;
- Si usano di preferenza colonne corte che eventualmente possono essere collegate in serie;
- Per proteggere la colonna vera e propria talvolta si usano delle precolonne con la stessa fase stazionaria ma di granulometria più grande.



HPLC: High Performance Liquid Chromatography

Raccogliatore di frazioni

- Per assicurare la riproducibilità dell'analisi, la variazione di temperatura deve essere molto inferiore all'1%;
- La termostatazione della colonna avviene o per circolazione forzata dell'aria o per immersione in un bagno termostatico (in questo caso la colonna è incamiciata);
- Può essere presente un fornello che per induzione scalda la colonna stessa.

HPLC: High Performance Liquid Chromatography

Raccoglitore di frazioni

- Nelle separazioni preparative si utilizzano sistemi automatici altrimenti si sostituisce il contenitore di raccolta manualmente utilizzando un corto tubicino flessibile di uscita.

Misuratori di flusso

- Sistemi a bolle
- Sistemi volumetrici
- Flussometro
- Sistema gravimetrico

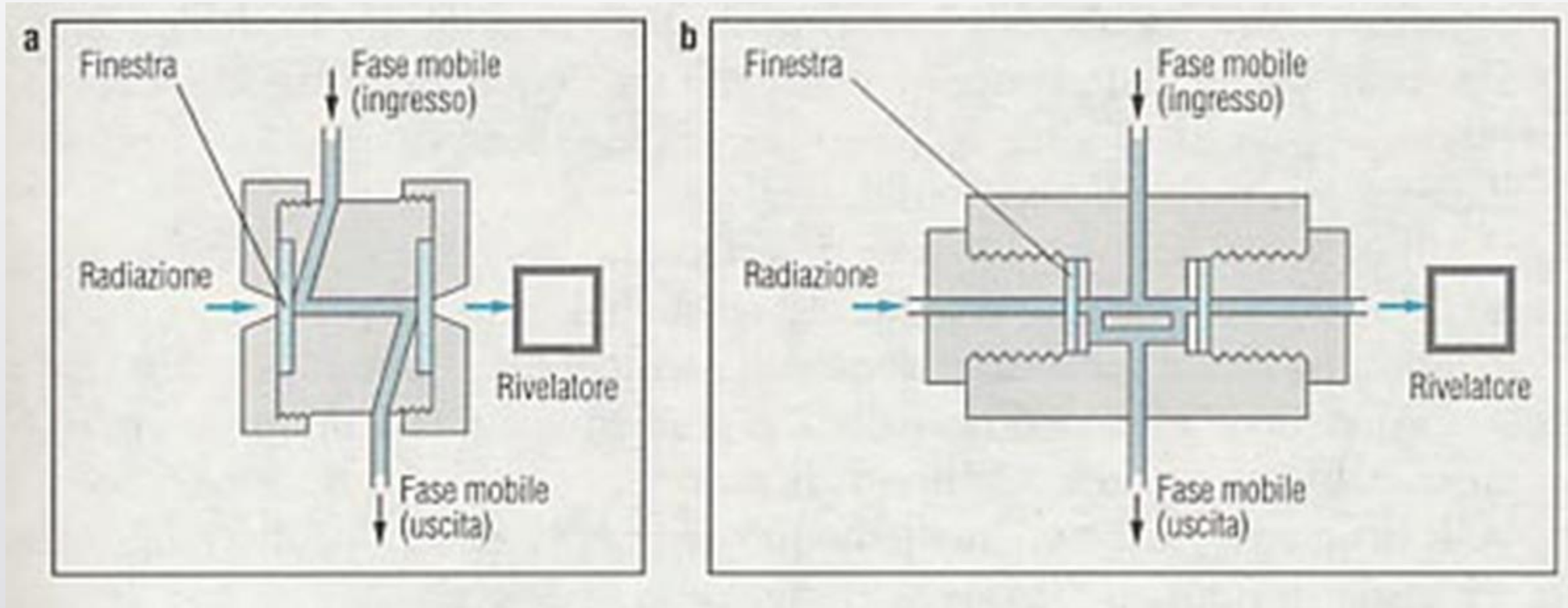
HPLC: High Performance Liquid Chromatography

Rivelatori

- Non esistono rivelatori universali;
- Le loro caratteristiche si giudicano in base ai seguenti parametri:
 - Selettività
 - Risposta o segnale
 - Stabilità (deriva)
 - Limite di rivelabilità
 - Rumore di fondo
 - Linearità
 - Sensibilità
 - Volume morto (volume del rivelatore stesso) che deve essere il più piccolo possibile.

HPLC: High Performance Liquid Chromatography

Vengono alloggiati in una piccola cella chiamata cella di flusso



HPLC: High Performance Liquid Chromatography

Caratteristiche principali dei rivelatori per HPLC						
Rivelatore	Grandezza misurata	Specificità	Limite di rivelabilità	Linearità	Compatibilità con l'eluizione in gradiente	Limitazioni
Spettrofotometro UV/visibile	assorbanza	selettivo	100-1000 pg	10^3-10^4	sì	Solo solventi a basso assorbimento nel vicino UV
Fluorimetro	fluorescenza	selettivo	1-10 pg	10^3-10^4	sì	Intervallo di linearità limitato
Spettrofotometro IR	assorbanza	selettivo	1 μ g	–	sì	Solo solventi a basso assorbimento nell'IR
Polarimetro	deviazione della luce polarizzata	selettivo	–	–	sì	Solo sostanze otticamente attive
Rifrattometro	indice di rifrazione	universale	100-1000 ng	3×10^3	no	Bassa sensibilità; richiede un elevato controllo della temperatura
Conduttimetro	conduttanza	selettivo	500-1000 ng	$\approx 10^5$	no	Sono esclusi i solventi elettroattivi; solo per specie conduttive
Elettrochimico	intensità di corrente	selettivo	10-1000 pg	10^3-10^4	sì	Solo per specie elettroattive; sono esclusi i solventi elettroattivi
Spettrometro di massa	massa	universale	10-100 pg	–	sì	Richiede una interfaccia adeguata

HPLC: High Performance Liquid Chromatography

Cromatografia a fasi normali

- La cromatografia liquido solido utilizza fasi stazionarie granulari a varia porosità, generalmente polari, che vengono accoppiate a fasi mobili non polari;
- Come fase stazionaria si usano: gel di silice, gel di silice pellicolare o allumina
- Come fase mobile si usano:

Solvente	ϵ^0	Solvente	ϵ^0
<i>n</i> -pentano	0,00	tetraidrofurano	0,45
isooctano	0,01	acetone	0,56
cicloesano	0,04	acetato di etile	0,58
tetracloruro di carbonio	0,18	anilina	0,62
xilene	0,26	acetonitrile	0,65
toluene	0,29	isopropanolo	0,82
benzene	0,32	etanolo	0,88
dietiletere	0,38	metanolo	0,95
cloroformio	0,40	acido acetico	alta

HPLC: High Performance Liquid Chromatography



Criteri per la scelta: fase mobile/fase stazionaria

- Si può procedere ad una separazione preliminare in TLC per valutare la scelta. In genere si usa gel di silice come fase stazionaria e un solvente apolare mescolato con piccole percentuali di un solvente polare.
- Questo viene fatto a livello di sviluppo metodo.
- Il controllo qualità ha già i metodi pronti da essere convalidati e poi utilizzati per le analisi.

Cromatografia su fase legata



Cromatografia su fase legata

- la fase stazionaria è legata chimicamente al supporto solido con cui forma un tutt'uno particolarmente stabile;
- Come fase stazionaria si usano: microparticelle di gel di silice, di zircone, di materiali contenenti legami C-F, polimeriche;
- La fase legata può essere di tipo polare e quindi con fase mobile non polare o di tipo non polare con fase mobile polare;
- Per la fase mobile: la fase legata può essere di tipo polare e quindi con fase mobile non polare o di tipo non polare con fase mobile polare.

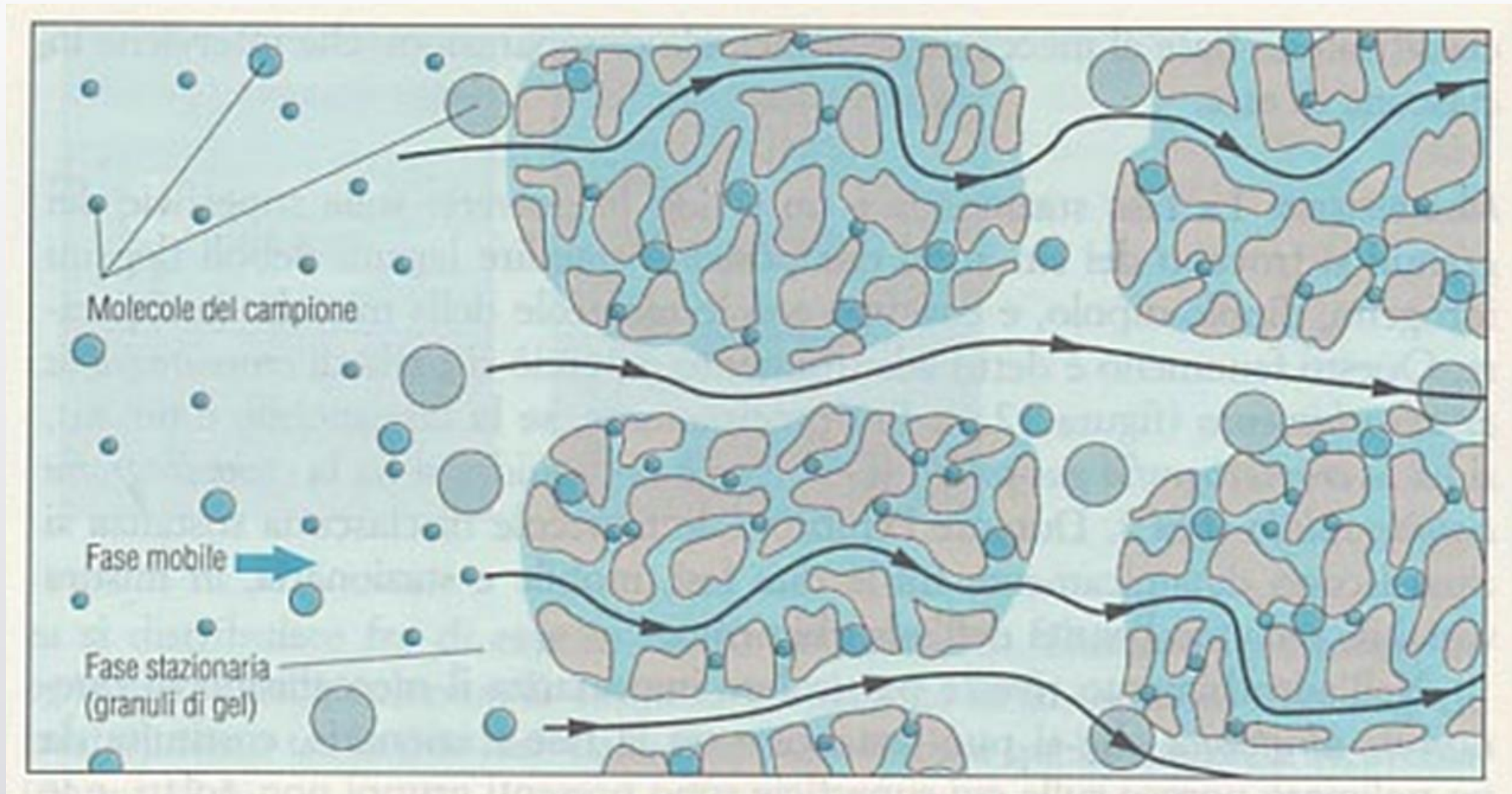
Cromatografia ad esclusione



Cromatografia ad esclusione

- Si tratta di una cromatografia su una fase stazionaria formata da un gel che non permette la permeazione alle molecole che superano una determinata dimensione (che quindi vengono eluite per prime).
- La fase stazionaria è costituita quindi da Gel che possono essere rigidi o semirigidi.
- Il solvente deve avere i seguenti requisiti: deve sciogliere completamente il campione, non deve interagire con esso e neppure con il gel, non deve causare fenomeni di ripartizione e deve essere compatibile con il rivelatore.

Cromatografia ad esclusione



Cromatografo ionico



Cromatografia a scambio ionico

- Si usa per analizzare le specie elettricamente cariche. Per separare queste specie si devono usare fasi stazionarie in grado di scambiare ioni con l'eluyente cioè degli scambiatori ionici.
- Non sono però esclusi meccanismi diversi come la ripartizione e l'adsorbimento.

Due sono le applicazioni principali:

- 1) separazione di molecole organiche elettricamente cariche;
- 2) separazioni di ioni inorganici.

Cromatografo ionico



Cromatografia a scambio ionico

Fase stazionaria:

- scambiatori cationici forti (analisi di cationi metallici);
- scambiatori cationici deboli (proteine e polipeptidi);
- scambiatori anionici forti (proteine);
- scambiatori anionici deboli.

Cromatografo ionico



Cromatografia a scambio ionico

I supporti sono di vario tipo:

- particelle di silice porosa;
- particelle di silice porosa legate a un copolimero;
- particelle pellicolari di resina scambiatrice;
- particelle porose polimeriche.

Cromatografo ionico



Cromatografia a scambio ionico

Fase mobile

- Si devono prendere in considerazione le variabili: pH, forza ionica e l'eventuale modificatore organico;
- Si tratta quasi sempre di soluzioni tampone.

Cromatografo ionico

Sistemi tampone di maggiore impiego in HPIEC e intervallo di pH operativo	
Tampone	Intervallo di pH
acido citrico	2,0-6,0
idrogenoftalato di potassio	2,2-6,5
idrogenocitrato disodico	2,2-6,5
formiato di sodio	3,0-4,4
acetato di sodio	4,2-5,4
diidrogenofosfato di potassio	2-8; 11-13
trietanolammina	6,7-8,7
perclorato di sodio	8,0-9,8
acetato di ammonio	8,6-9,8
borato di sodio	8,0-9,8
diidrogenofosfato di sodio	11-12

Spettrofotometro UV-Vis

Spettrofotometro UV-Vis

Si distinguono:

- rivelatori a lunghezza d'onda fissa (i più diffusi)
- rivelatori a lunghezza d'onda variabile
- rivelatori a serie di diodi (diode array)

Spettrofotometro UV-Vis

