

Lezione del 15.06.2020

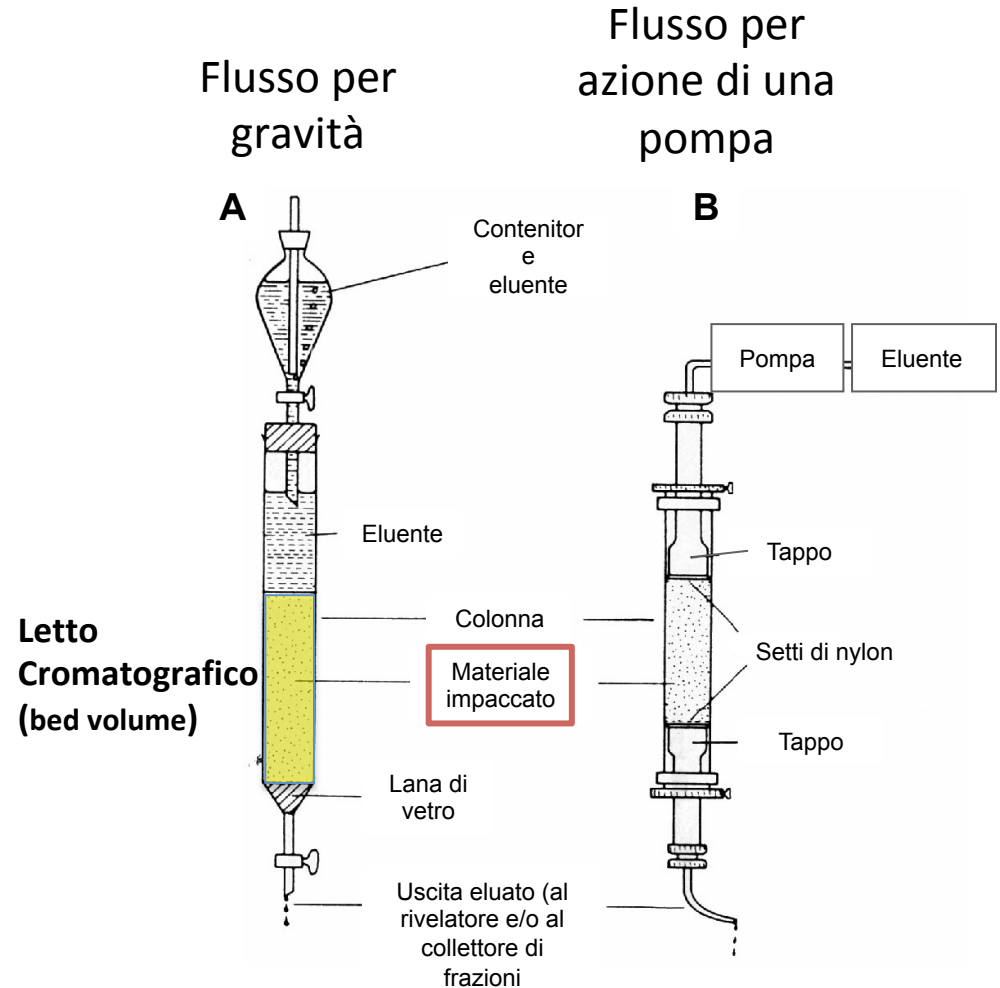
2) CROMATOGRAFIA SU COLONNA

La miscela da separare, caricata sulla cima della colonna, viene trascinata all'interno della matrice da una aggiunta continua di solvente (**fase mobile o eluente**).

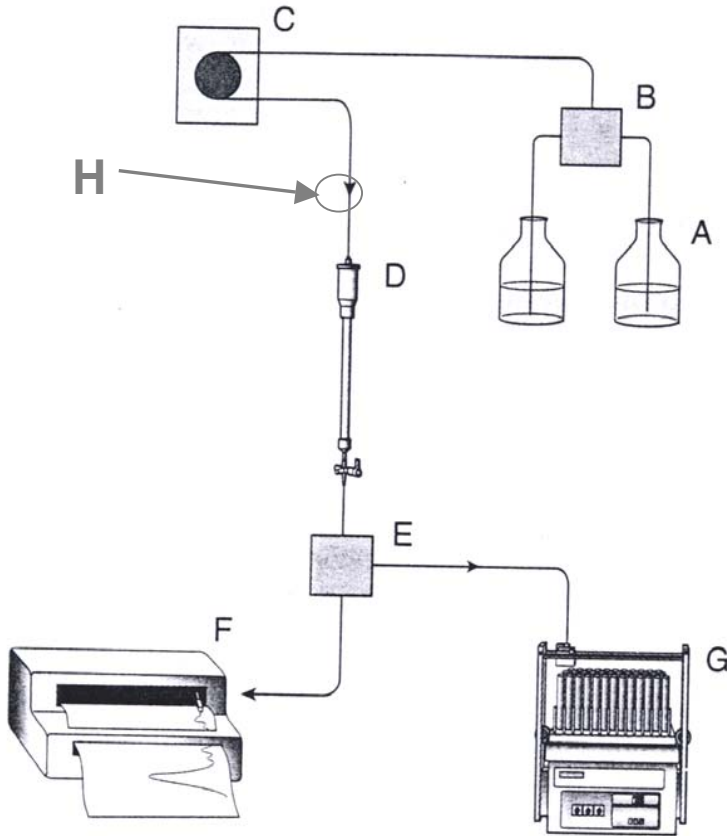
Le varie componenti della miscela sono rallentate in misura variabile e quindi tendono a separarsi.

Le varie componenti usciranno in tempi diversi dalla colonna, e saranno raccolte in frazioni diverse **di ELUATO**.

La colonna può essere collegata direttamente con un sistema di rivelazione e un registratore (*spettrofotometro..*)



Schema del processo



- A:** tampone di eluizione
- B:** miscelatore o formatore di gradiente
- C:** sistema di pompaggio
- D:** colonna cromatografica
- E:** rivelatore
- F:** plotter per cromatogramma
- G:** raccogliitore di frazioni
- H:** rubinetto a tre vie o loop di iniezione

Cromatografia liquida a **bassa pressione (LPLC)** con pressioni inferiori ai 5 bar (1 bar= 0.1MPa)



La resistenza opposta dalla fase stazionaria al flusso della fase mobile è minima

Cromatografia liquida a **media pressione (MPLC)** con pressioni tra 6 e 50 bar

Vengono utilizzate le stesse apparecchiature e attrezzature

Cromatografia liquida ad **alta pressione (HPLC)** con pressioni superiori ai 50 bar



Sono metodi altamente efficienti in termini di RISOLUZIONE

Principio fondamentale

Coefficiente di ripartizione: definisce come un composto si distribuisce tra due fasi non miscibili

$$K_D = \frac{\text{concentrazione}_X \text{ nella fase S}}{\text{concentrazione}_X \text{ nella fase M}}$$

Coefficiente *effettivo* di ripartizione o *fattore di capacità* : definisce la **quantità totale** di sostanza presente nella fase stazionaria rispetto a quella nella fase mobile

$$k'_D = \frac{[X]_S V_S}{[X]_M V_M} = K_D \frac{V_S}{V_M}$$

Permette di valutare l'interazione con la fase stazionaria

Che cosa vuol dire?

- Se $K_D=1$ vuol dire che la concentrazione del composto nella fase A e B è uguale

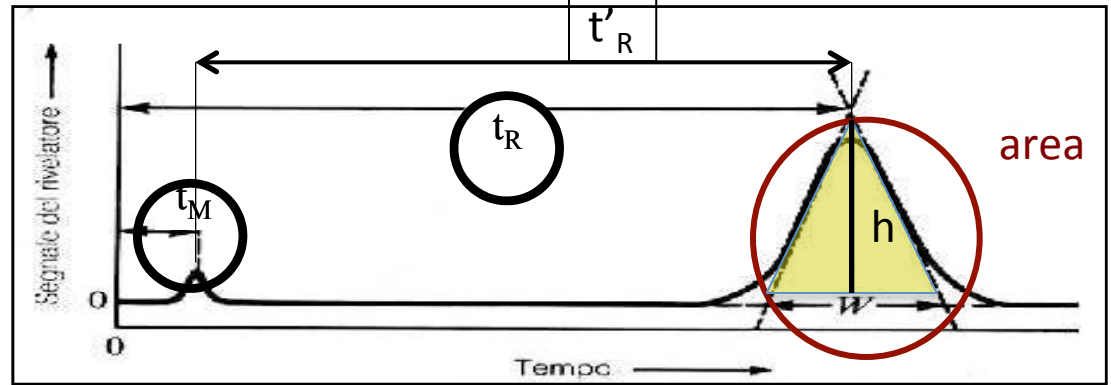
ma se

$$V_S = 10\text{cm}^3 \text{ e } V_M = 1\text{cm}^3$$

la quantità totale di composto presente nella fase S è
10 volte maggiore della quantità di sostanza in
fase M

$$k'_D = \frac{[X]_S V_S}{[X]_M V_M} = K_D \frac{V_S}{V_M} \qquad k'_D = 1 \frac{10}{1} = 10$$

Tutti i tipi di cromatografia (tranne quella planare) sono caratterizzati alla fine da un CROMATOGRAMMA



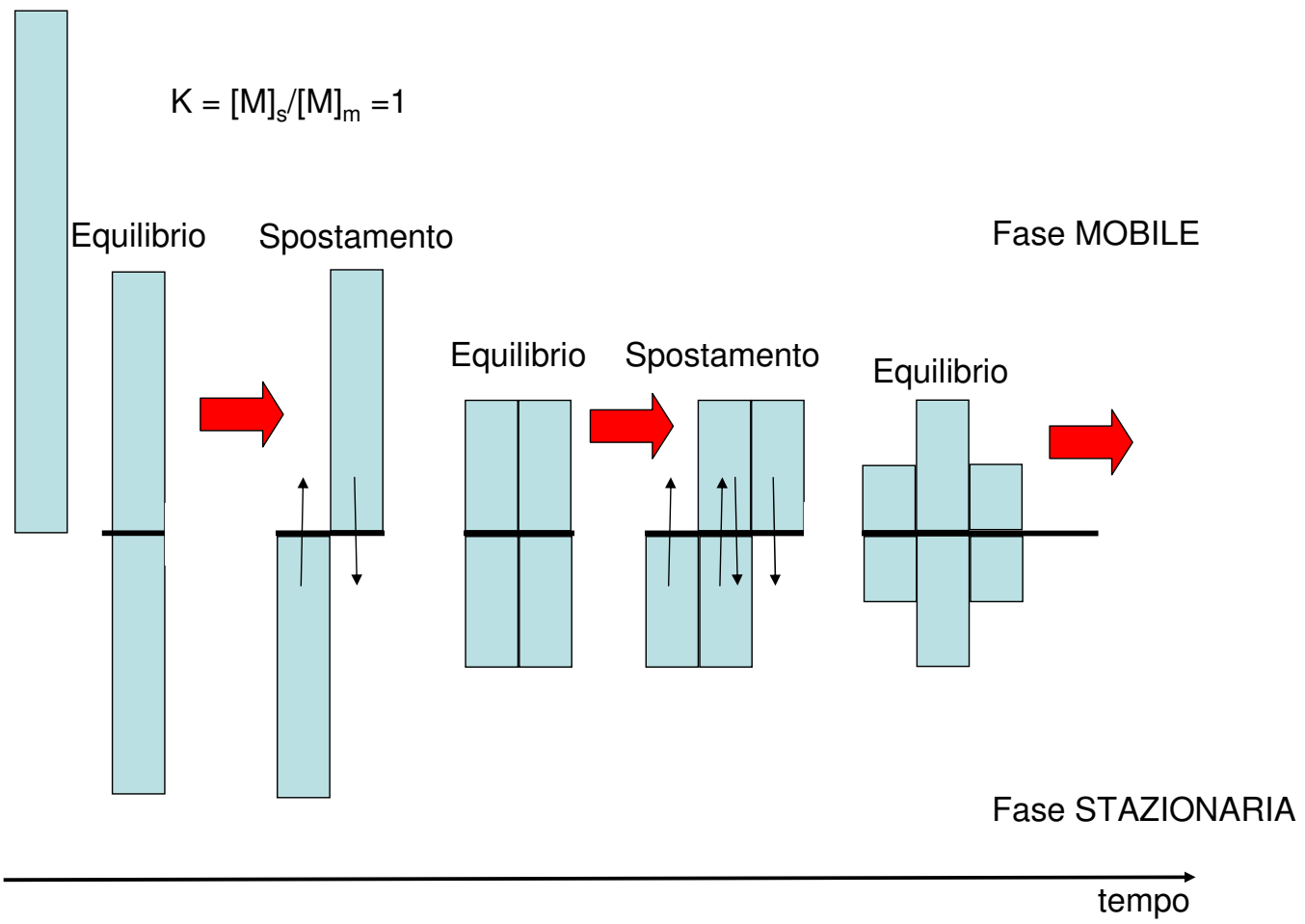
Tempo morto (t_M): tempo di ritenzione di un composto che non è trattenuto e che passa attraverso la colonna alla stessa velocità con cui fluisce la fase mobile lungo la colonna (oppure **volume morto** ($V_M = t_M \cdot vel_{flusso}$))

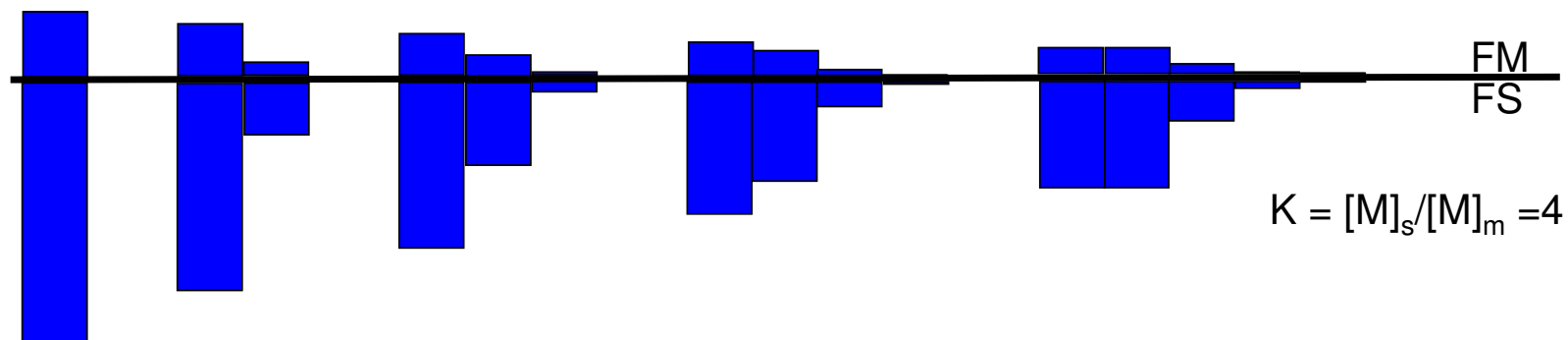
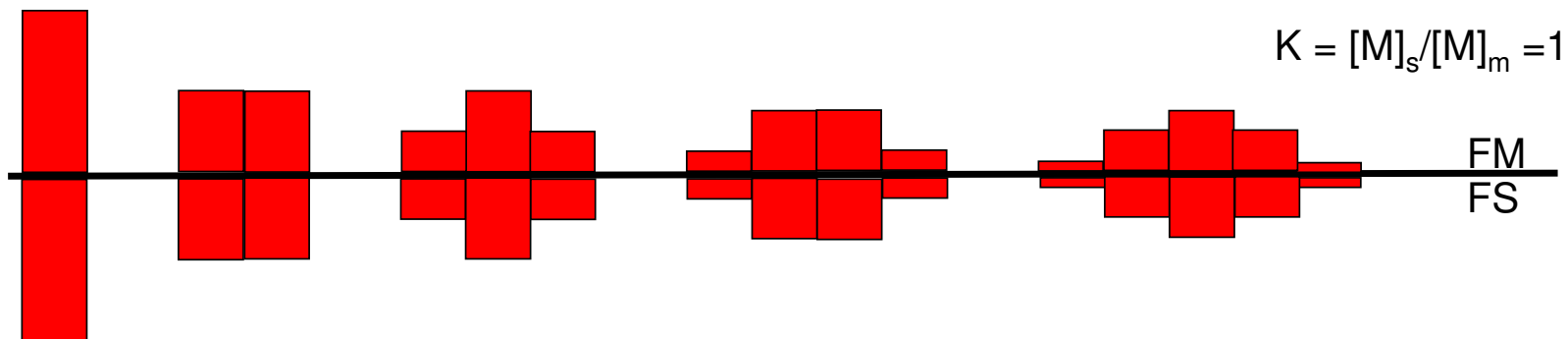
Tempo di ritenzione (t_R): tempo necessario alla sostanza iniettata per essere eluita dall'inizio all'uscita della colonna (oppure **volume di ritenzione** ($V_R = t_R \cdot vel_{flusso}$)).

Larghezza della base (w_b): assumono di solito la forma di una gaussiana (Poiché $w = 4\tau$, dove τ è il tempo che la fase mobile impiega per percorrere la distanza σ , ossia $t = \sigma / (L/t_R) = s t_R/L$)

Altezza del picco (h): distanza tra il punto massimo e la linea di base

Ampiezza del picco a metà altezza ($w_{1/2} = 2,35\sigma$)



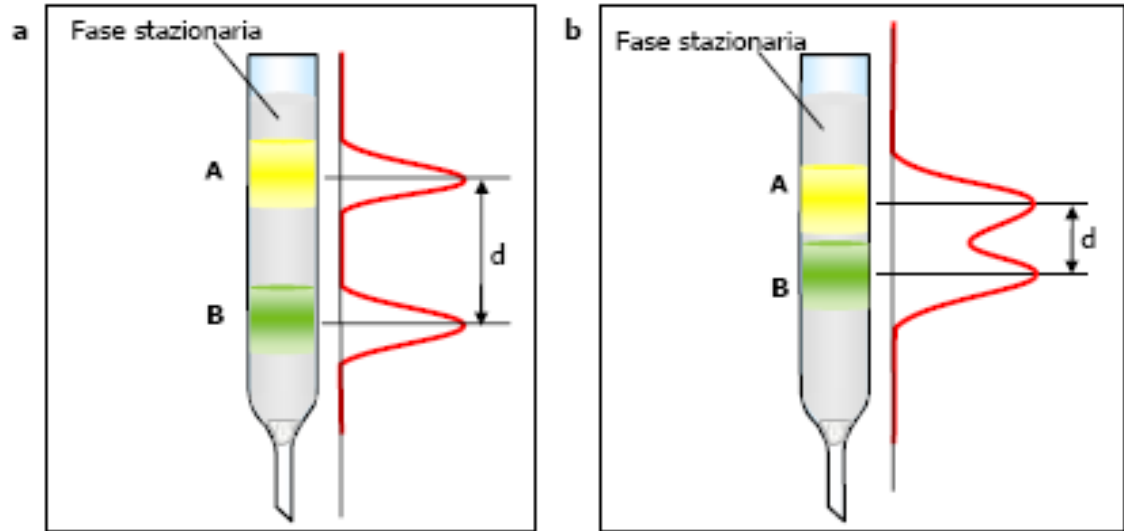


Quali informazioni posso ottenere da un cromatogramma?

SELETTIVITA'

Capacità di eluire a VELOCITA' DIVERSE le diverse specie chimiche presenti nella miscela

Bande distanziate tra i componenti di una miscela



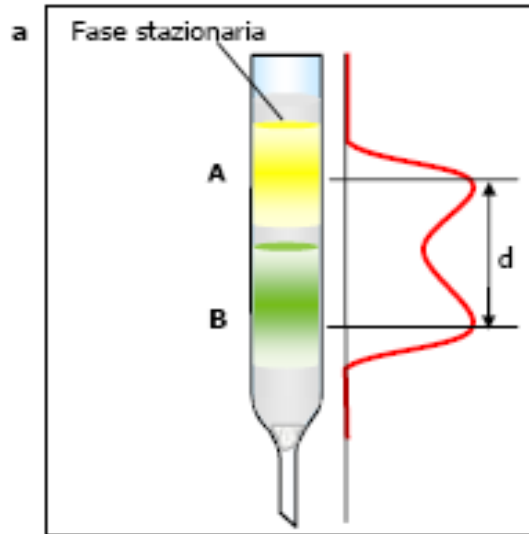
La SELETTIVITA' viene espressa dal FATTORE di SEPARAZIONE o ritenzione relativa (a):

$$a = \frac{t_{R1} - t_M}{t_{R2} - t_M} = \frac{t'_{R1}}{t'_{R2}}$$

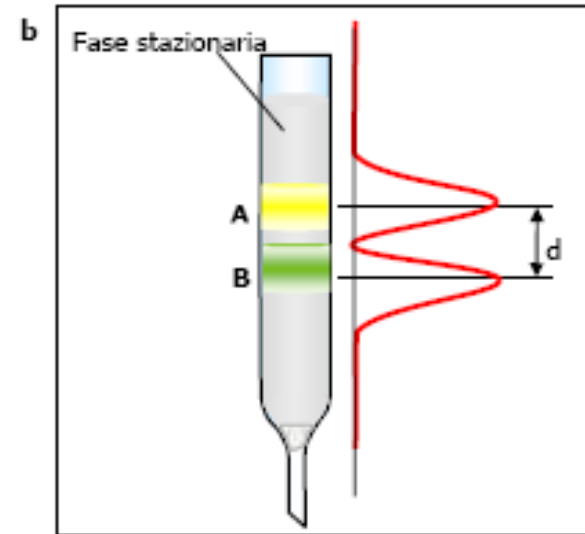
Quali informazioni posso ottenere da un cromatogramma?

EFFICIENZA

Indica la capacità del sistema cromatografico di eluire **molecole della stessa specie** con la stessa velocità in modo da favorire la formazione di **picchi stretti**



Poco efficiente

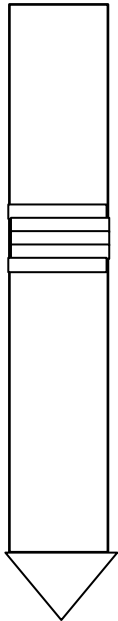


efficiente

Il parametro più semplice con il quale valutare l'efficienza di separazione è la larghezza del picco (w_b)

- Dipende dalla specie chimica
- Dipende da t_R che dipende da diversi fattori.....

L'EFFICIENZA può essere misurata in termini di "PIATTI TEORICI" o di "ALTEZZA EQUIVALENTE del PIATTO TEORICO (HETP)



Piatto teorico: sezione o strato di colonna nei quali si instaura l'**equilibrio** di ripartizione dell'analita tra la fase stazionaria e la fase mobile

Maggiore è il numero dei piatti teorici (N), maggiori sono gli equilibri a cui l'analita si sottopone

Poiché $w = 4\sigma$, dove σ è la deviazione std

$$H = L/N$$

$$N = \frac{t_r^2}{\sigma^2} = 16 \frac{t_r^2}{w^2} = 5.54 \left(\frac{t}{w_{1/2}} \right)^2$$

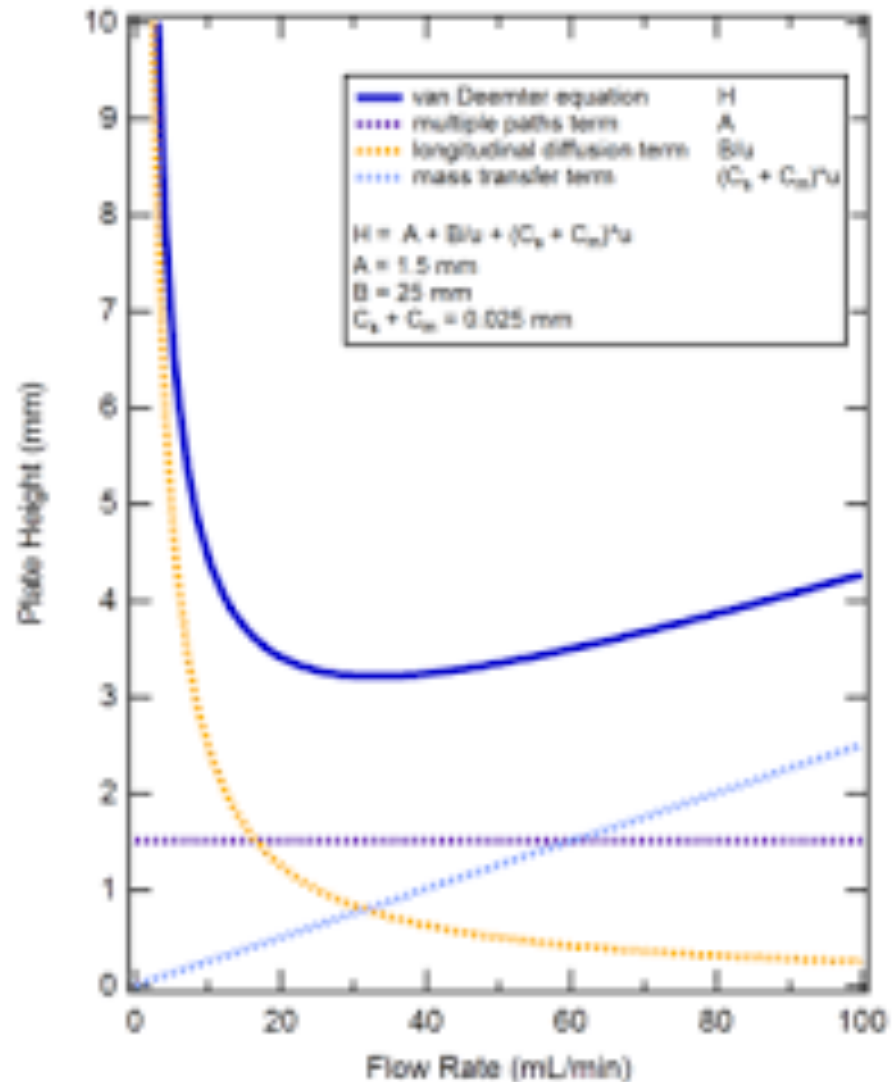
IL NUMERO di PIATTI TEORICI E L'ALTEZZA RELATIVA DEL PICCO possono essere calcolati valutando il picco cromatografico

EQUAZIONE di van Deemter

Ci sono tre contributi all'allargamento del picco cromatografico (e quindi all'aumento di H):

Eq. di Van Deemter

HETP: $A + B/u + C u$



Il valore di HETP e quindi la forma del picco cromatografico è determinato da diversi fattori:

Eq. di Van Deemter **HETP: $A + B/u + C u$**

u = velocità media della fase mobile

A, B, C fattori che contribuiscono all'allargamento del picco

A - è una costante che dipende dalle dimensioni e forma dei granuli della fase stazionaria (influenza i diversi possibili percorsi del soluto) è *un parametro di diffusione (m)*;

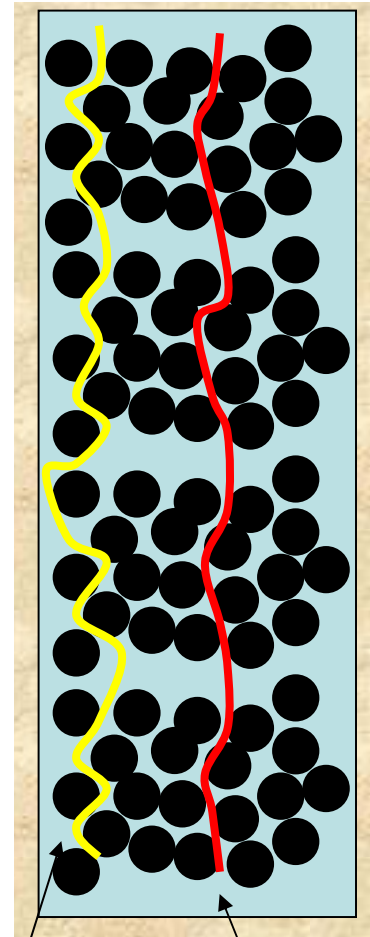
B - coefficiente di diffusione longitudinale:

(esprime la tendenza delle molecole di soluto a diffondere nella fase mobile, che è maggiore a basso flusso)

C - resistenza al trasferimento di massa, (esprime la difficoltà a raggiungere l'equilibrio tra fase mobile e fase stazionaria dettato dal coefficiente di partizione, e la sua importanza aumenta all'aumentare della velocità di flusso).

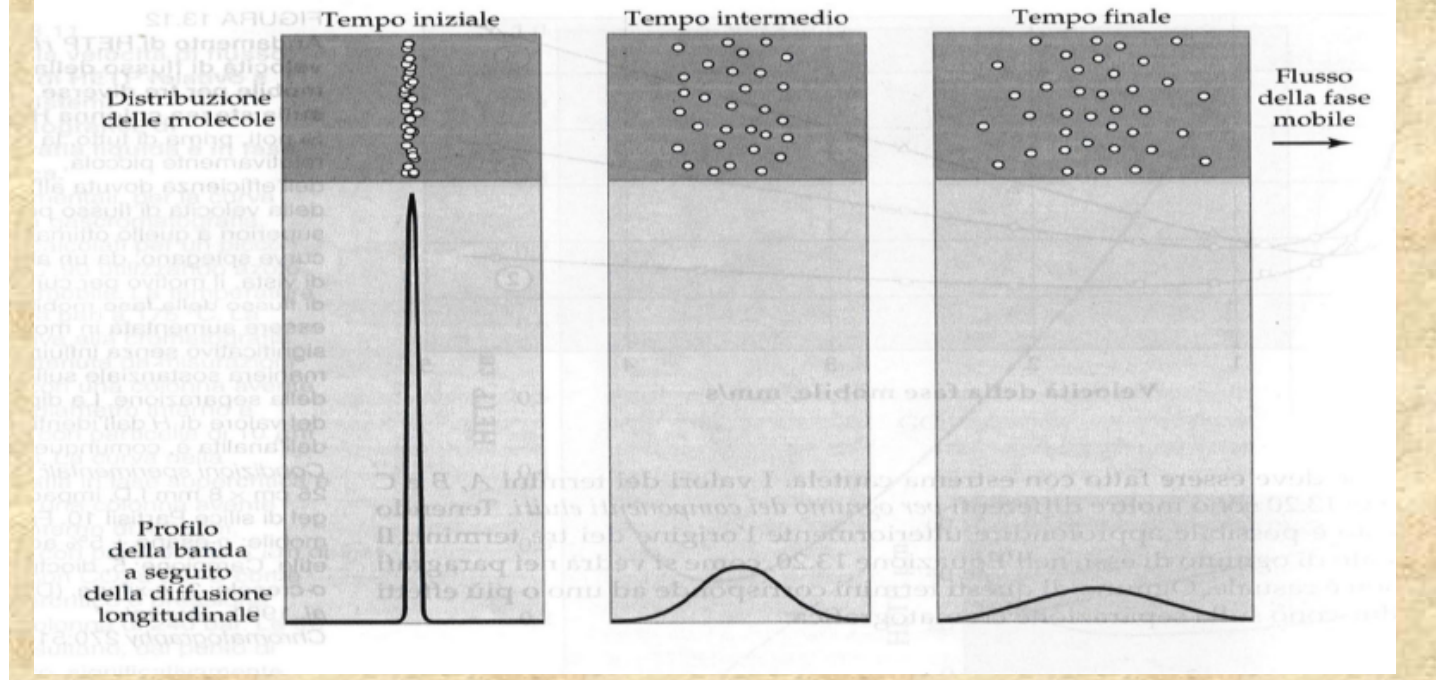
A - è una costante che dipende dalle dimensioni e forma dei granuli della fase stazionaria (influenza i diversi possibili percorsi del soluto)
è un *parametro di diffusione (m)*;

La molteplicità dei cammini disponibili ad una molecola di analita all'interno della colonna cromatografica impaccata con le particelle di fase stazionaria



Meccanismo della DIFFUSIONE LONGITUDINALE (termine B/u dell'Eq. di van Deemter)

Tale effetto è meno pronunciato all'aumentare del Flusso della fase mobile



Maggiore è la velocità u della fase mobile minore sarà il tempo a disposizione dell'analita per diffondere al suo interno, dunque minore sarà anche l'allargamento del picco.

***C u* – Resistenza al trasferimento di massa.**

Se la velocità della fase mobile è elevata e se l'analita ha una forte affinità per la fase stazionaria, l'analita nella fase mobile esce prima dell'analita nella fase stazionaria originando un grande allargamento della banda. Questo effetto è tanto maggiore quanto più è veloce la fase mobile.

Rapporto di ripartizione o rapporto di **CAPACITA'**, k'

$$k'_D = \frac{[X]_S V_S}{[X]_M V_M} = K_D \frac{V_S}{V_M}$$

Permette di valutare l'interazione con la fase stazionaria

Mi permette di valutare l'interazione dell'analita con la fase stazionaria

Il rapporto di capacità è una misura del tempo effettivo che un analita impiega ad eluire dalla colonna confrontato con quello di un analita escluso o non ritenuto (non si ripartisce nella fase stazionaria perciò $k_d = 0$)

$$k' = \frac{t_R - t_M}{t_M} = \frac{V_R - V_M}{V_M}$$

Può essere ricavato dai parametri del cromatogramma

k' è tanto più elevato quanto più a lungo è trattenuto il soluto.

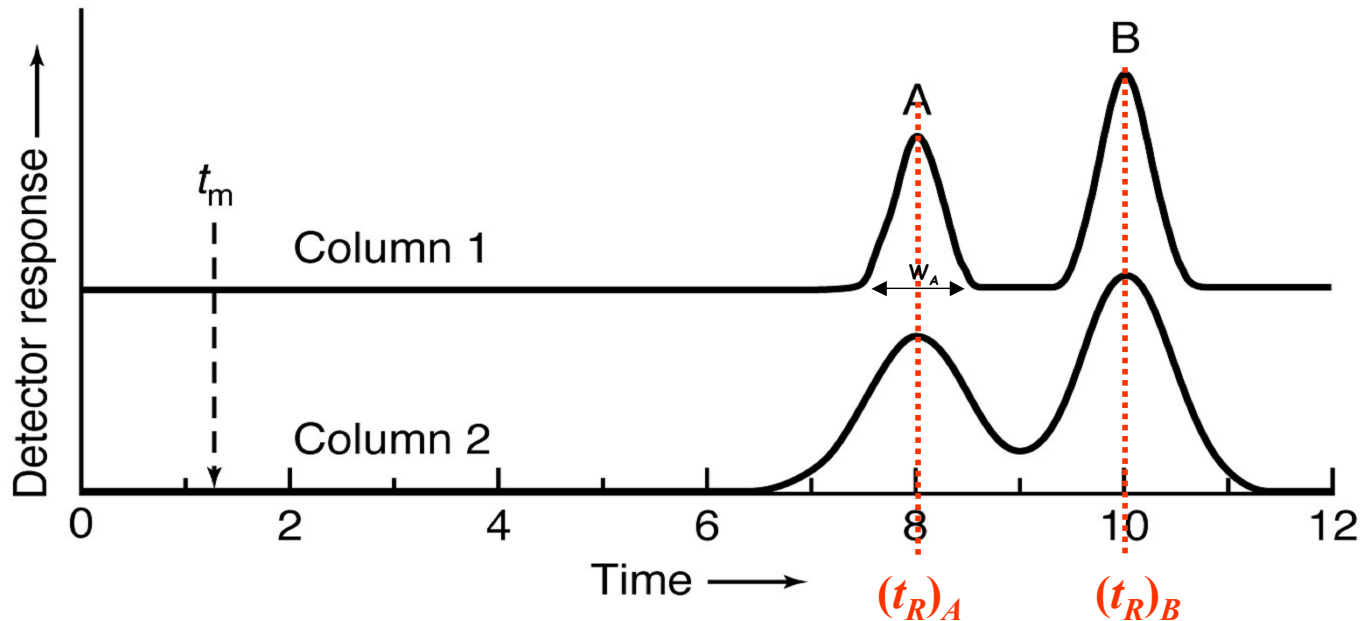
Parametri da valutare in una separazione cromatografica:

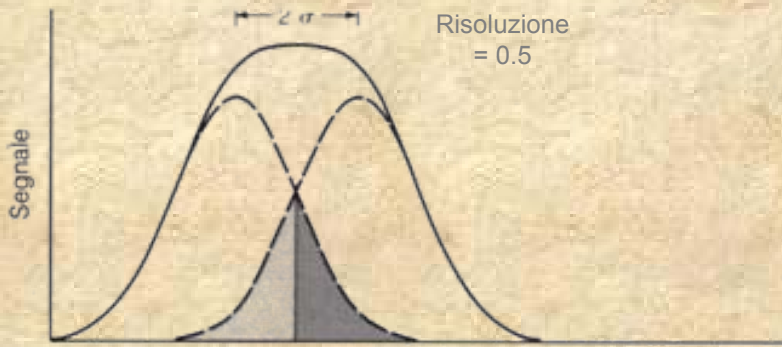
RISOLUZIONE di una COLONNA (capacità, efficienza e selettività)

La risoluzione, R , è una misura quantitativa della capacità di separare due analiti.

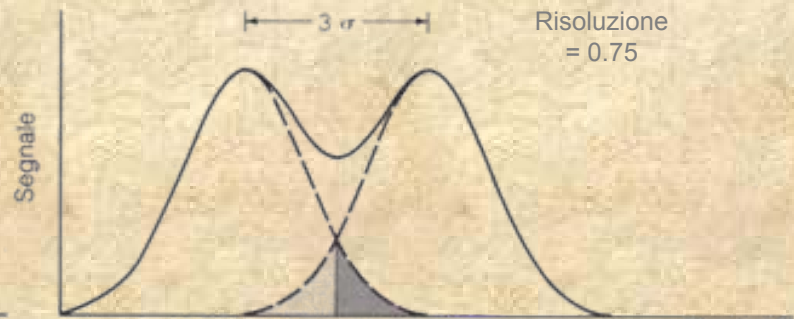
$$R = \frac{2[(t_R)_B - (t_R)_A]}{W_A + W_B}$$

$W = 4\sigma$ $R > 1,5$

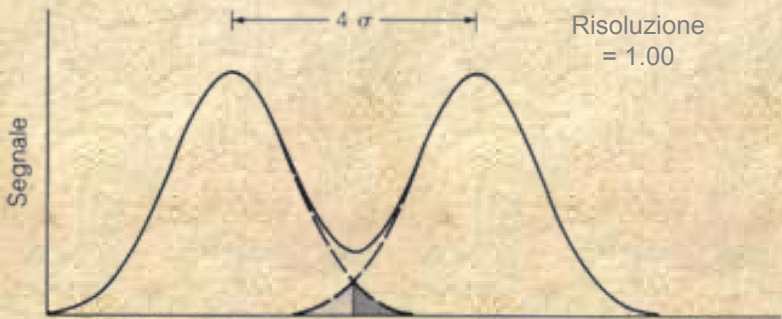




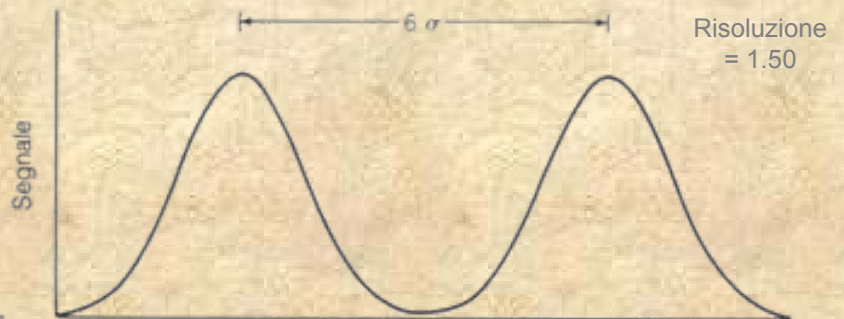
(a)



(b)



(c)



(d)

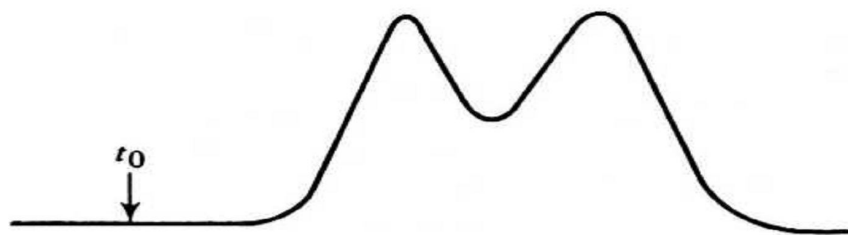
Tempo

La Risoluzione (R_s) o separazione dei picchi cromatografici dipende da:

- Scelta fase stazionaria
- Scelta fase mobile
- Temperatura
- Lunghezza colonna

L' Efficienza (N) o allargamento dei picchi cromatografici dipende da:

- Fattori costruttivi
- Impaccamento colonna
- Velocità fase mobile



A

risoluzione scarsa



B

**buona risoluzione dovuta a
buona efficienza**

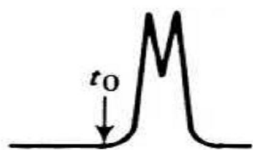
← **picchi stretti**



C

**buona risoluzione dovuta
a buona selettività**

← **picchi distanti**



D

**risoluzione scarsa dovuta ad
un basso fattore di capacità**

Dettaglio matrici cromatografia

Cellulosa:

E' un polisaccaride lineare, formato da MONOMERI di GLUCOSIO con legame β 1-4. [figura 1].

La presenza di 3 GRUPPI IDROSSILICI per monomero rende la matrice MOLTO IDROFILO e facile da derivatizzare.

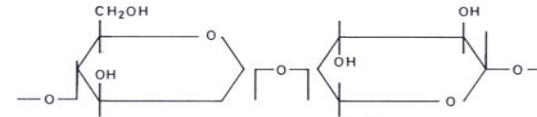


Fig.1: Cellulosa: Struttura chimica



Fig.2: Trattamento della cellulosa asciutta (a) con NaOH: effetti (b)

Agarosio:

E' un polisaccaride ottenuto dall'agar (estratto da alghe).

E' composto da catene del disaccaride AGAROBIOSO (D-GALATTOSO e 3,6-ANIDRO-1 GALATTOSO). [figura 3]

Struttura:

gel IDROFILO MOLTO POROSO ottenuto per raffreddamento di soluzioni 2% w/v. [figura 4].

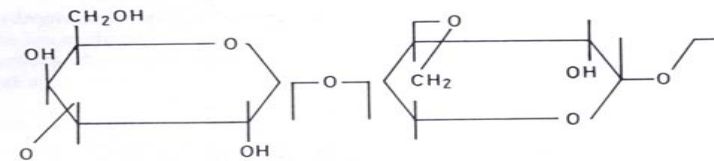


Fig.3: Agarosio: Struttura chimica



Fig.4: Struttura del gel

Destrano

E' un *POLISACCARIDE* EXTRACELLULARE prodotto dal batterio *Leuconostoc mesenteroides*.

E' formato da catene di GLUCOSIO con legame α 1-6.

E' meno stabile della cellulosa all'idrolisi acida ma regge il trattamento con 0.1 M di HCl fino a 2 ore.

Stabile a pH 2-12.

Cross-linking: EPICLORIDRINA

Poliacrilamide

Si ottiene per polimerizzazione dell' ACRILAMIDE.

L'agente che permette il cross-linking è la METILEN-BISACRILAMIDE.

La matrice che si ottiene è adatta soprattutto alla gel-permeation.

E' autoclavabile e ha buona stabilità chimica tuttavia il monomero dell'acrilamide (tossico) può essere lentamente rilasciato.

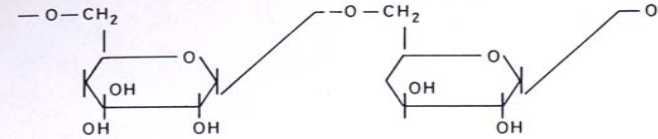


Figure 7. The chemical structure of dextran: α 1-6 linked glucose residues.

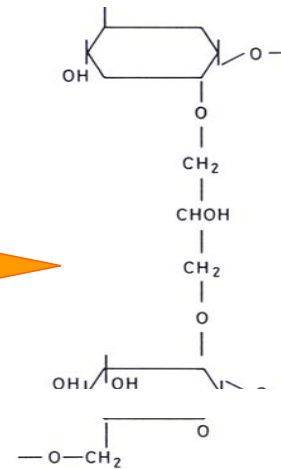


Figure 8. Epichlorhydrin cross-linked dextran (e.g. Sephadex).

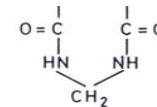


Figure 9. The repeating unit of polyacrylamide.

Unità ripetitiva
della poliacrilamide

Le resine possono essere porose o non porose

Devono essere:

- fisicamente stabili
- Chimicamente resistenti anche a condizioni stringenti di lavaggio
- Avere bassi livelli di interazione non-specifica
- Modificabili per essere specifiche

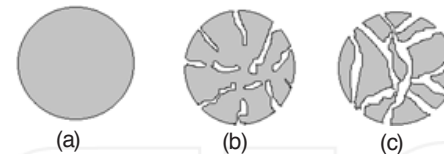


Figure 5. Schematic presentation of different matrix types (a) non-porous beads (b) microporous beads (c) macroporous beads

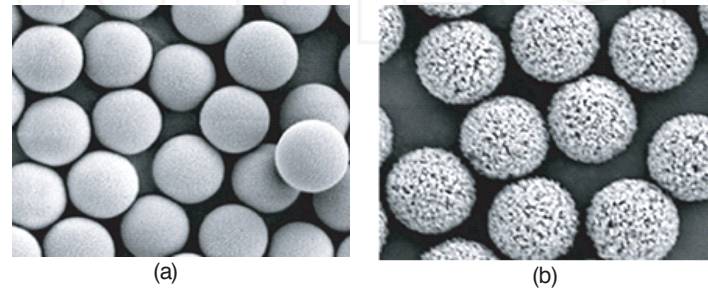


Figure 6. (a) Non-porous beads (b) Porous beads

A SECONDA DELLA TIPOLOGIA DEL METODO DI SEPARAZIONE POSSONO ESSERE OPPORTUNAMENTE FUNZIONALIZZATE

Relazione tra dimensione della particella, pressione e risoluzione

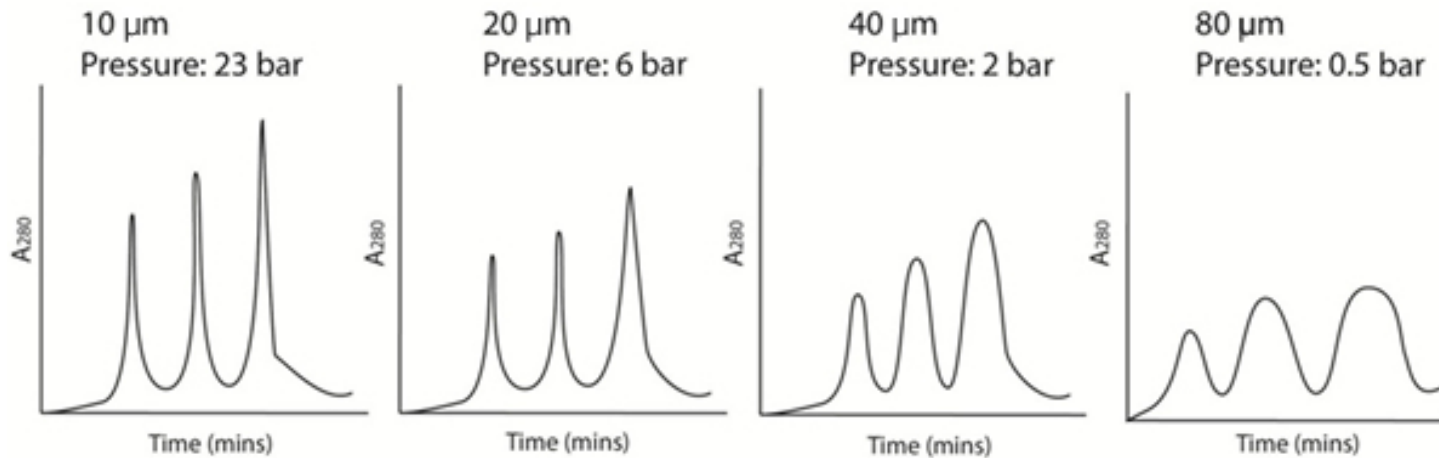
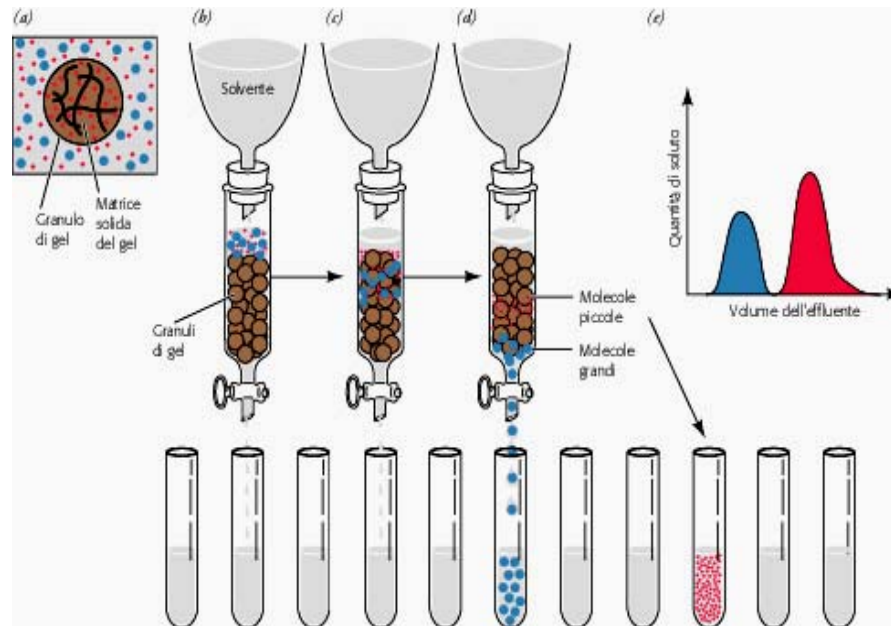


Fig. 6. Relationship between resin particle size, pressure, and resolution.

CROMATOGRAFIA di ESCLUSIONE (SEC: size exclusion chromatography)



Separare i componenti di una miscela in base alle **dimensioni molecolari**

fase stazionaria: polimero in forma di gel

fase mobile: può essere un solvente organico, e in tal caso si parla di Gel Permeation Chromatography (GPC), oppure acqua o una soluzione tampone, e si parla di Gel Filtration Chromatography (GFC).

APPLICAZIONI

La cromatografia di esclusione molecolare o Gel filtrazione può essere utilizzato per:

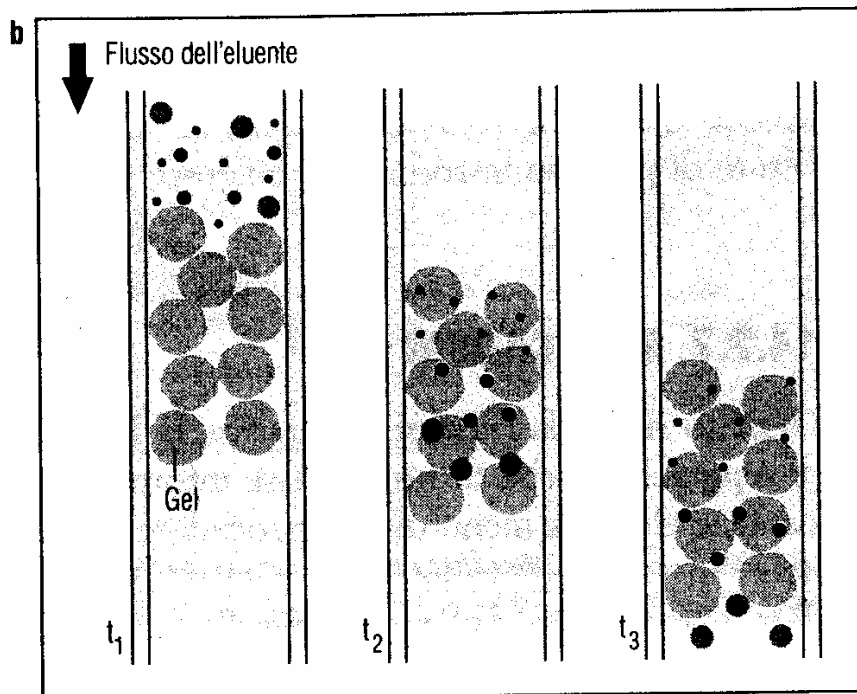
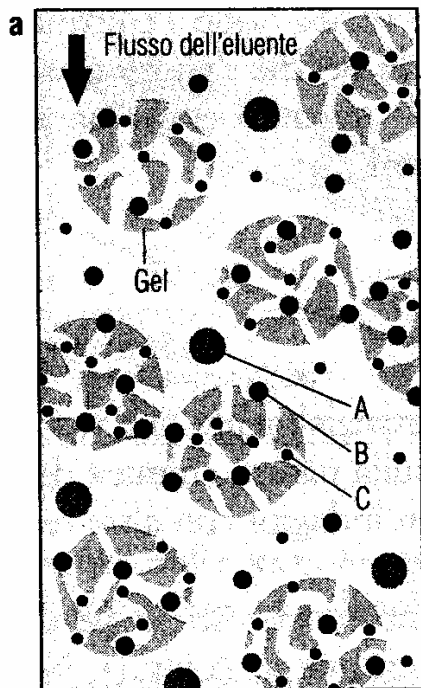
Purificazione di DNA o proteine

Modifica del tampone

Separazione di molecola in gruppi

Allontanare contaminanti a basso peso molecolare (per es. sali)

Allontanare prodotti, cofattori o inibitori dagli enzimi



Anche in questo caso abbiamo dei parametri fissi di cui tener conto:

Il **volume morto** (V_0) è il volume di colonna non occupato dalle particelle del gel;

Il **volume interno** (V_i) è il volume dei pori presenti nelle particelle di gel;

Il volume totale della fase mobile in colonna o semplicemente **volume totale** (V_t) è tutto il volume a disposizione delle particelle della miscela, cioè:

$$V_t = V_0 + V_i + V_{\text{matrix}}$$

Il **volume di ritenzione** (V_R), detto anche **volume di eluizione** (**Ve**), è il volume di fase mobile eluita dal momento dell'ingresso fino all'uscita dalla colonna di una determinata sostanza. Tale volume viene misurato in corrispondenza del massimo del relativo picco cromatografico

Il **volume di ritenzione corretto** (V'_e) viene definito in modo del tutto analogo a quello per le altre tecniche cromatografiche:

$$V'_e = V_R - V_0$$



V_0



V_i

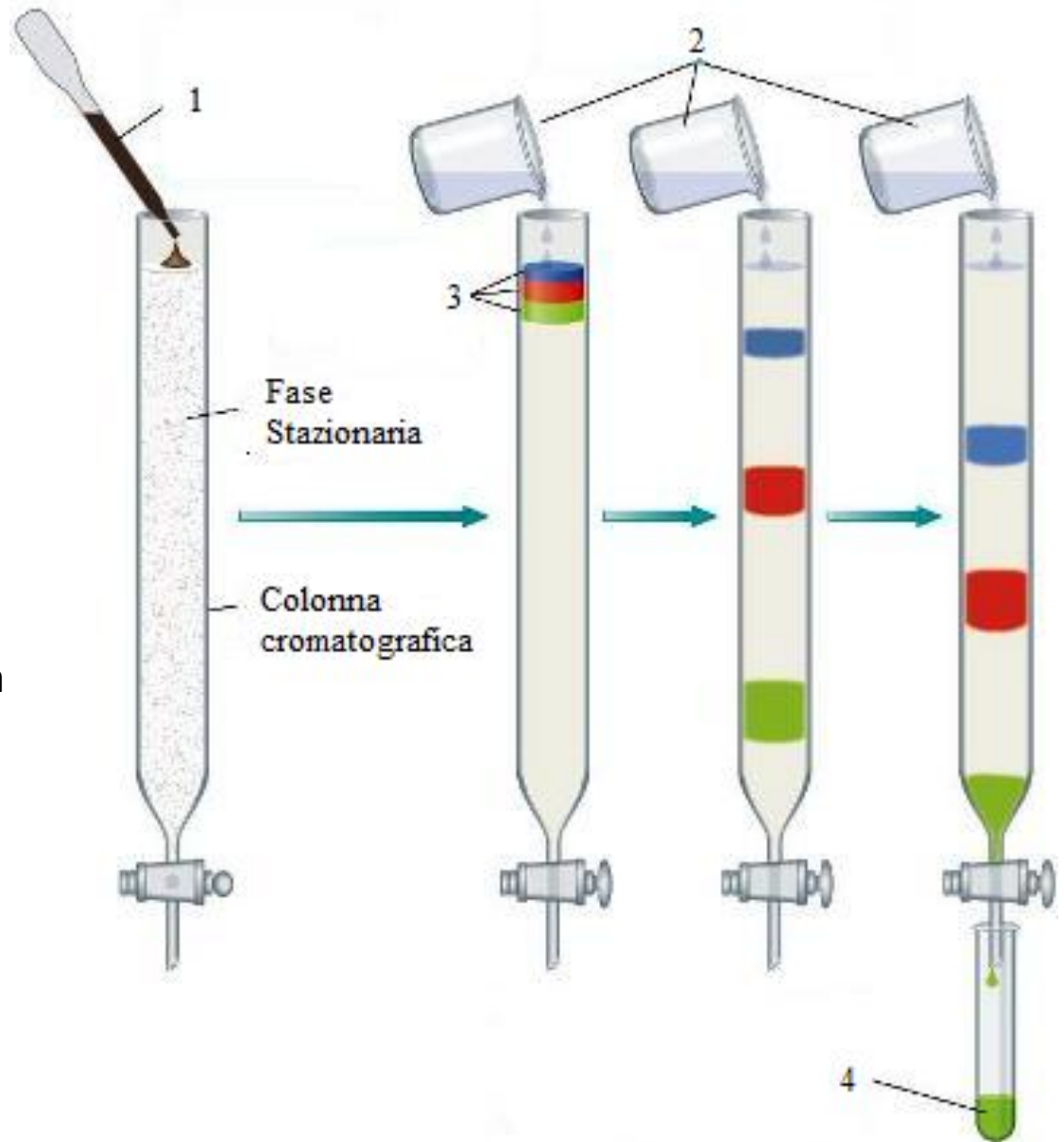


V_t

Volume di campione:

1-5% del volume di separazione o bed volume

Il rapporto tra \varnothing colonna e lunghezza deve essere da 1:20 a 1:100



Proprietà dei gel

Limite di esclusione

Esprime la **massa molare** della più piccola molecola che viene **esclusa** dai pori di gel.

Limite di permeazione

Esprime la **massa molare** della più grande molecola che **può penetrare** in tutto il volume interno del gel

Intervallo di frazionamento

Intervallo delle masse molari delle molecole che vengono frazionate dal gel

Distribuzione dei pori

Le dimensioni dei pori di un determinato gel non sono tutte uguali, ma si distribuiscono entro un intervallo (mesh)

Le particelle di gel possono essere di forma irregolare oppure sferica; quella sferica, ovviamente, è la forma ideale

La qualità della separazione è tanto migliore quanto più ristretto è l'intervallo in cui si distribuiscono le dimensioni delle particelle
In genere, si usano granulometrie da 100 a 200 mesh, ma anche fino a 400 mesh

Il gel viene preparato miscelando il polimero disidratato con un solvente opportuno; questo comporta una espansione del polimero e quindi un **rigonfiamento** delle particelle. La quantità di solvente assorbita per ogni grammo di gel secco dipende dalla dimensione dei pori.

Normalmente sono indicazioni che vengono fornite dalla casa produttrice

TABLE 5.2 Mesh Sizes of Adsorbents and Typical Applications

Mesh Sizes	Applications
20–50	Crude preparative work, very high flow rate
50–100	Preparative applications, high flow rate
100–200	Analytical separations, medium flow rate
200–400	High-resolution analytical separations, low flow rate

Sephadex

Chemical and physical properties

Sephadex is a bead-formed gel prepared by cross-linking dextran with epichlorohydrin (Fig. 22). Table 5 lists the different G-types of Sephadex and their physical properties.

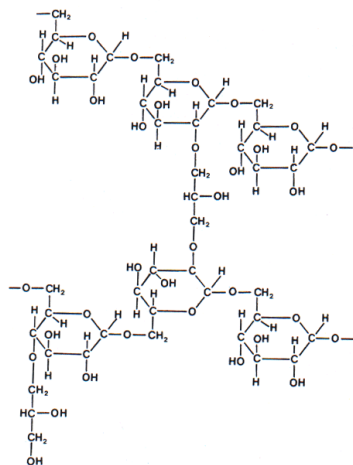


Fig. 22. Partial structure of Sephadex.

Sephadex

separation Pharmacia dextran

Table 5. Properties of Sephadex.

Gel type	Dry bead size μm	Fractionation range		Swelling factor ml/g
		Globular proteins	Dextrans	
Sephadex G-10	40 - 120	- 700	- 700	2 - 3
Sephadex G-15	40 - 120	- 1 500	- 1 500	2.5 - 3.5
Sephadex G-25 Coarse	100 - 300	1 000 - 5 000	100 - 5 000	4 - 6
Sephadex G-25 Medium	50 - 150	1 000 - 5 000	100 - 5 000	4 - 6
Sephadex G-25 Fine	20 - 80	1 000 - 5 000	100 - 5 000	4 - 6
Sephadex G-25 Superfine	10 - 40	1 000 - 5 000	100 - 5 000	4 - 6
Sephadex G-50 Coarse	100 - 300	1 500 - 30 000	500 - 10 000	9 - 11
Sephadex G-50 Medium	50 - 150	1 500 - 30 000	500 - 10 000	9 - 11
Sephadex G-50 Fine	20 - 80	1 500 - 30 000	500 - 10 000	9 - 11
Sephadex G-50 Superfine	10 - 40	1 500 - 30 000	500 - 10 000	9 - 11
Sephadex G-75	40 - 120	3 000 - 80 000	1 000 - 50 000	12 - 15
Sephadex G-75 Superfine	10 - 40	3 000 - 70 000	1 000 - 50 000	12 - 15
Sephadex G-100	40 - 120	4 000 - 150 000	1 000 - 100 000	15 - 20
Sephadex G-100 Superfine	10 - 40	4 000 - 100 000	1 000 - 100 000	15 - 20
Sephadex G-150	40 - 120	5 000 - 300 000	1 000 - 150 000	20 - 30
Sephadex G-150 Superfine	10 - 40	5 000 - 150 000	1 000 - 150 000	18 - 22
Sephadex G-200	40 - 120	5 000 - 600 000	1 000 - 200 000	30 - 40
Sephadex G-200 Superfine	10 - 40	5 000 - 250 000	1 000 - 150 000	20 - 25

G-10 is well suited for the separation of biomolecules such as peptides (MW > 700) from smaller molecules (MW < 100).

G-50 is suitable for the separation of molecules MW > 30 000 from molecules MW < 1 500 such as labeled protein or DNA from unconjugated dyes. The medium is often used to remove small nucleotides from longer chain nucleic acids.

G-25 is recommended for the majority of group separations involving globular proteins. These media are excellent for removing salt and other small contaminants away from molecules that are greater than MW 5000. Using different particle sizes enables columns to be packed according to application requirements, see Table 5.1. The particle size determines the flow rates and the maximum sample volumes that can be applied. For example, smaller particles give higher column efficiency (narrow, symmetrical peaks), but may need to be run more slowly as they create higher operating pressures.

G-100 is recommended for molecular weight determination

Table 1
Some media for gel-filtration

Material	Media^a and fractionation range (globular proteins)	Advantages	Disadvantages
Dextran	Sephadex G-10 0–700 Da Sephadex G-25 1–5 kDa Sephadex G-50 1.5–30 kDa Sephadex G-100 4–150 kDa Sephadex G-200 5–600 kDa	Smaller fractionation ranges (G-10, G-25) are good for desalting	Expanded forms require low pressures/hydrostatic heads
Agarose	Sepharose 6B 10–4,000 kDa Sepharose 4B 60–20,000 kDa Sepharose CL-4B 60–20,000 kDa Sepharose CL-2B 70–40,000 kDa	Good for larger molecules. Cross-linked (CL) forms are more robust	Must be kept wet and not allowed to dry out
Allyl dextran-bis-acrylamide	Sephacryl S-200 HR 5–250 kDa Sephacryl S-300 HR 10–1,500 kDa Sephacryl S-400 HR 20–8,000 kDa	Not biodegradable, mechanically robust	Must be kept wet and not allowed to dry out

This table lists some typical media used for gel-filtration. It is not exhaustive, and there are many others, including media for industrial use in special configurations. Users should consult manufacturers' technical information regarding suitability for particular requirements

Da daltons, *kDa* kilodaltons

^aSephacryl[®], Sephadex[®], Sepharose[®], and Superdex[®] are registered trademarks of GE Healthcare. Toyopearl resins from Tosoh Bioscience may also be used for size-exclusion chromatography; these are made from polymethacrylate and are available with different fractionation ranges (Toyopearl[®] is a registered trademark of Tosoh Bioscience)

Fase mobile

Si possono usare **soluzioni acquose saline** oppure **solventi organici**.

Nella preparazione delle soluzioni saline occorre tenere sotto controllo alcuni fattori

Alcune separazioni devono essere eseguite a pH ben determinati. E ogni gel ha un ben preciso campo di applicazione, al di fuori del quale possono verificarsi idrolisi o modificazioni della struttura del polimero.

Gli agenti ossidanti devono essere evitati, perché causano modificazioni nella struttura dei polimeri.

Per evitare la formazione di bolle nella colonna, i gas disciolti nell'eluente (soprattutto CO₂) devono essere eliminati.

Quali sono le caratteristiche di cui tener conto per la scelta della colonna:

- **il tipo di separazione** che si intende effettuare (suddivisione in due o più frazioni o gruppi);
- **l'intervallo di frazionamento** del gel;
- **l'intervallo di distribuzione** delle masse molari dei componenti del campione.

Le colonne per SEC sono di vetro borosilicato oppure di plastica (trasparente e inerte), con elevata resistenza meccanica