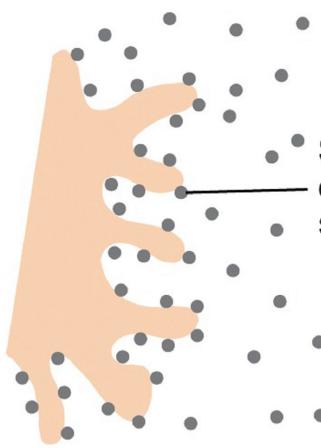


tipologie di cromatografia di adsorbimento

La prima forma di cromatografia:

Alcuni materiali solidi, “adsorbenti”, trattengono le molecole sulla loro superficie.



Adsorption chromatography

F.S. solida fissa

F.M. liquida o gassosa

Sulla superficie dei granuli si trovano **siti attivi** che possono stabilire legami deboli (reversibili!) con le molecole della miscela da separare.

Si parla quindi di cromatografia di adsorbimento, che può essere gas- solido o liquido-solido a seconda della natura della fase mobile

I siti di adsorbimento possono essere occupati dall'**eluente** o dall'**analita**.

E' INDICATA PER SEPARARE MOLECOLE CON POLARITA' DIVERSE

Cromatografia a scambio ionico

Tale metodo permette di separare le molecole sulla base della **carica netta superficiale**

- carica totale
- densità di carica
- distribuzione della loro carica.

I gruppi che contribuiscono alla formazione della carica netta di una molecola, hanno diversi valori di pKa dipendenti dalla loro struttura e dal microambiente in cui si trovano.

La loro carica è strettamente dipendente dal pH

La chromatografia a scambio ionico si avvantaggia del fatto che il rapporto esistente tra la carica netta e il pH per una specifica proteina E' UNICO.

- alta capacità (**quantità di gruppi carichi o potenzialmente carichi presenti per unità di peso di resina secca** mEq di gruppi ionizzabili/mg di resina)
- alto potere di risoluzione
- condizioni di separazione “non aggressive”
- versatile: ampio spettro di applicazioni
- capacità di concentrazione dell’analita
- costi contenuti

Fase mobile:

soluzione contenente ioni in grado di competere con gli ioni presenti nel campione

NaCl è il più usato in assoluto

..ma non sempre risulta la scelta migliore

La scelta è basata:

sulla specificità con cui scambia sulla resina

sulla sua concentrazione

dal flusso della fase mobile

IMPORTANTE

De-gasare la fase mobile: la CO₂ da origine a acido carbonico

L'eluizione può essere **ISOCRATICA O A GRADIENTE**

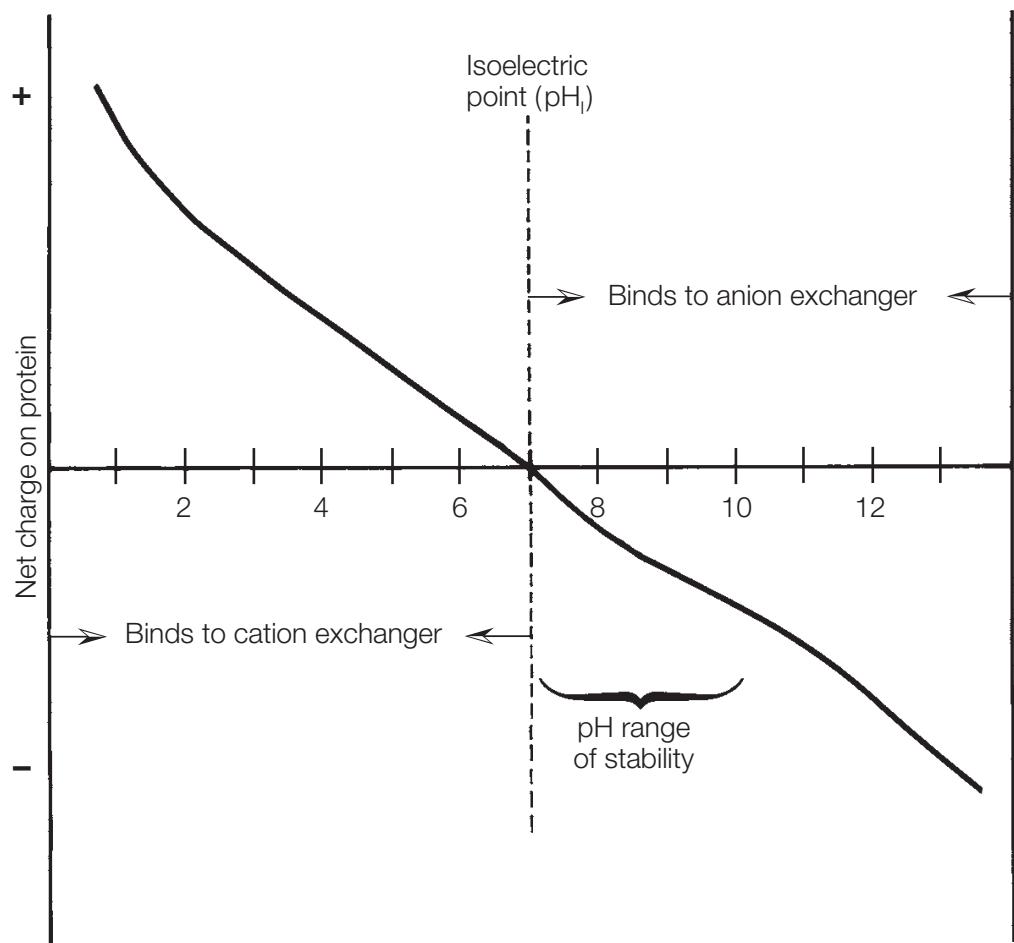
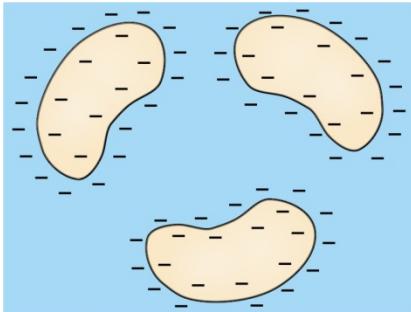
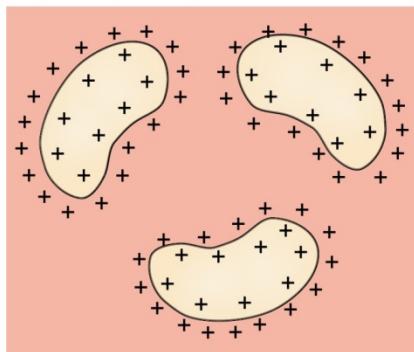


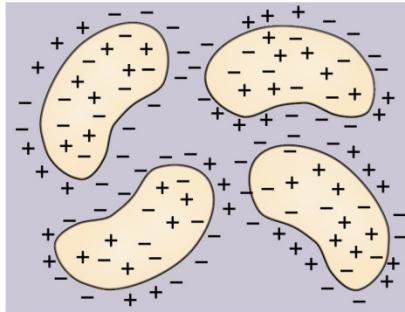
FIGURE 5.6 The effect of pH on the net charge of a protein.



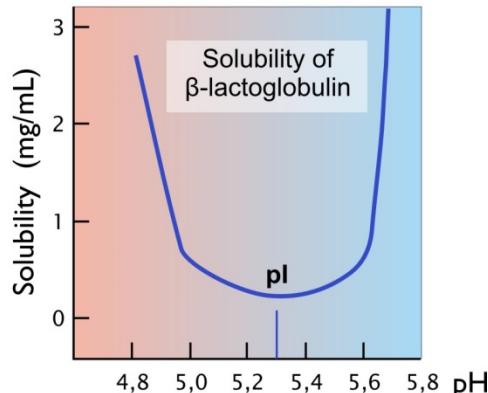
a) At pH values above the isoelectric point the protein is negatively charged



c) At pH values below the isoelectric point the protein is positively charged



b) $\text{pH}=\text{pI}$, the number of negative and positive charges is equal



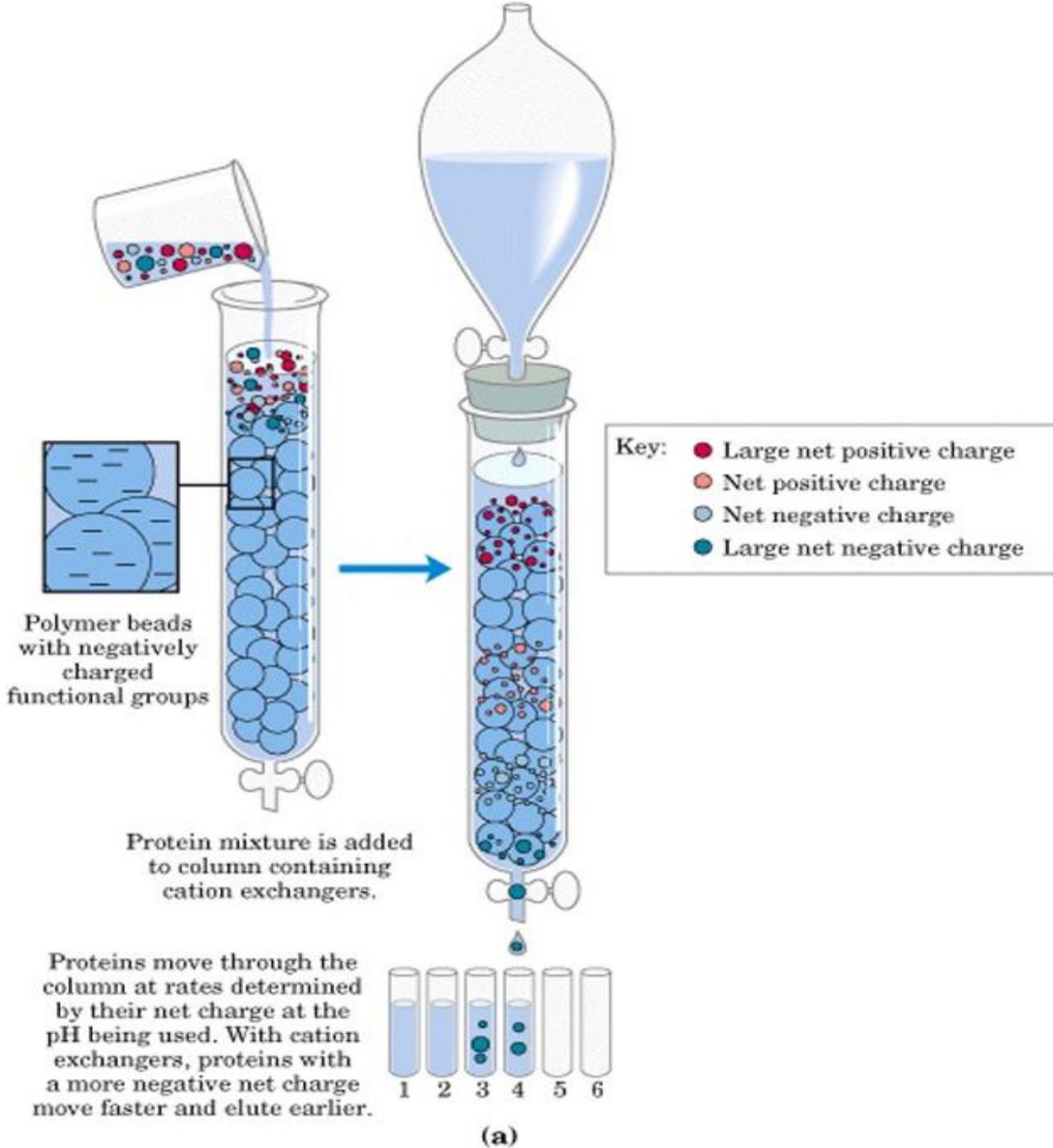
d) pH-dependence of the solubility of the β -lactoglobulin protein

Resin Type	Cation Exchanger	Anion Exchanger
Net Charge of Molecule of Interest	+	-
Charge of Resin	-	+
Running Conditions	Run at 0.5–1.5 pH units below the pI of the molecule of interest	Run at 0.5–1.5 pH units above the pI of the molecule of interest



TABLE 5.3 Ion-Exchange Resins

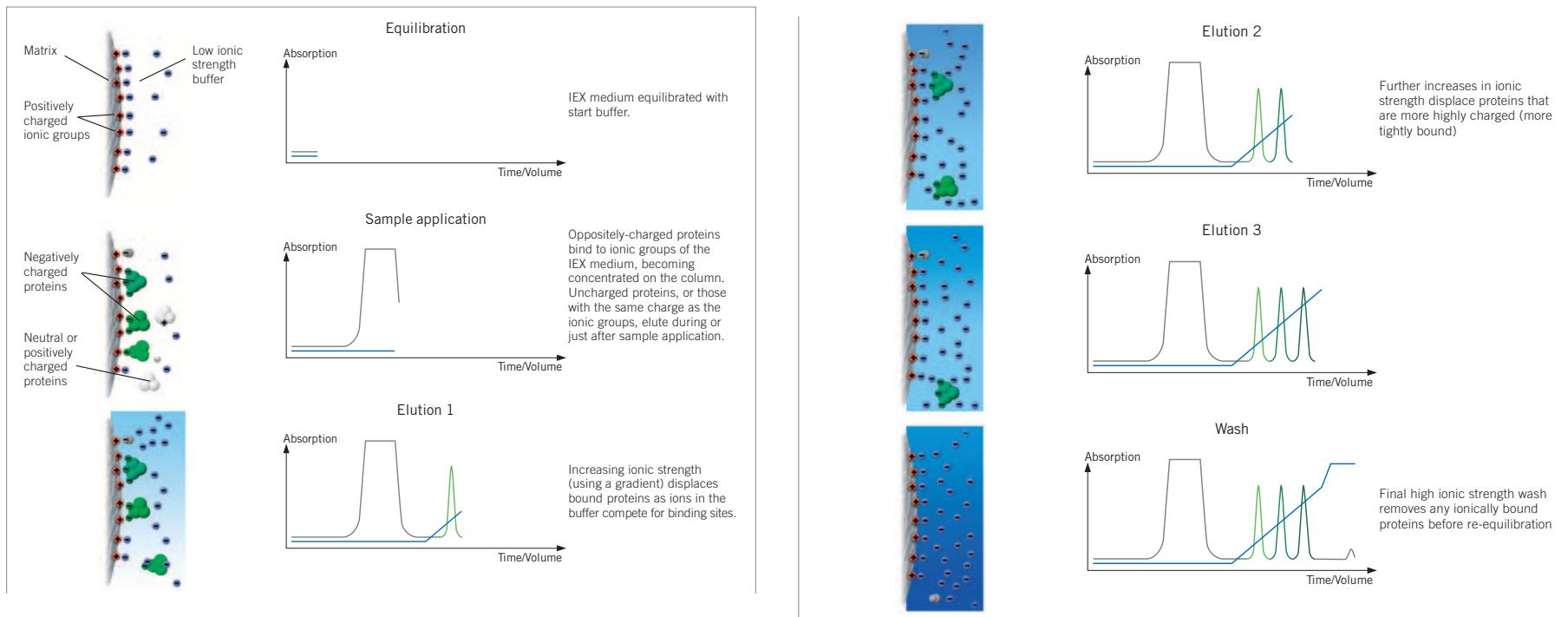
Name	Functional Group	Matrix	Class
Anion Exchangers			
AG 1	Tetramethylammonium	Polystyrene	Strong
AG 3	Tertiary amine	Polystyrene	Weak
DEAE-Sephacel	Diethylaminoethyl	Sephacel	Weak
PEI-cellulose	Polyethyleneimine	Cellulose	Weak
DEAE-Sephadex	Diethylaminoethyl	Dextran	Weak
QAE-Sephadex	Diethyl-(2-hydroxyl-propyl)-aminoethyl	Dextran	Strong
DEAE-Sepharose	Diethylaminoethyl	Agarose	Weak
Cation Exchangers			
AG 50	Sulfonic acid	Polystyrene	Strong
Bio-Rex 70	Carboxylic acid	Acrylic	Weak
CM-Sephacel	Carboxymethyl	Sephacel	Weak
P-Cellulose	Phosphate	Cellulose	Intermediate
CM-Sephadex	Carboxymethyl	Dextran	Weak
SP-Sephadex	Sulfopropyl	Dextran	Strong
CM-Sepharose	Carboxymethyl	Agarose	Weak
SP-Sepharose	Sulfonic acid	Agarose	Strong



Una proteina che non ha carica netta ad un pH equivalente al proprio punti isoelettrico (pI) non interagirà con un mezzo carico....

....ma ad un pH superiore al proprio pI, la proteina legherà un mezzo carico positivamente o ad uno **scambiatore di anioni**.

....ma ad un pH inferiore al proprio pI, la proteina legherà un mezzo carico negativamente o **scambiatore di cationi**



SELETTIVITA' in funzione del pH:

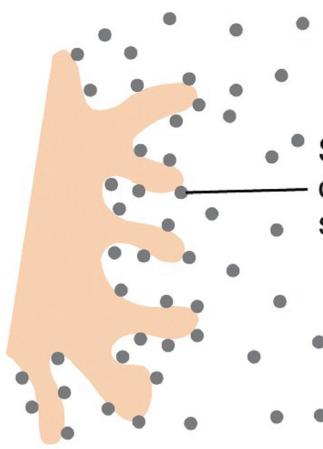
L'optimum di selettività si ottiene normalmente a valori di pH per i quali sia massima la differenza tra le curve di titolazione (**maggior differenza in carica netta**) e utilizzando uno scambiatore di ioni con una carica opposta alla carica della proteina a quel particolare pH

**Talvolta la curva di titolazione di una proteina non è
totalmente predittiva sul comportamento della proteina: il pl
è dato dalla carica netta totale, la cromatografia a scambio
ionico è basata solo sulla presenza della carica netta
superficiale!!!**

..altre tipologia di cromatografia di adsorbimento

La prima forma di cromatografia:

Alcuni materiali solidi, “adsorbenti”, trattengono le molecole sulla loro superficie.



Adsorption chromatography

F.S. solida fissa

F.M. liquida o gassosa

Sulla superficie dei granuli si trovano **siti attivi** che possono stabilire legami deboli (reversibili!) con le molecole della miscela da separare.

Si parla quindi di cromatografia di adsorbimento, che può essere gas- solido o liquido-solido a seconda della natura della fase mobile

I siti di adsorbimento possono essere occupati dall'**eluente** o dall'**analita**.

E' INDICATA PER SEPARARE MOLECOLE CON POLARITA' DIVERSE

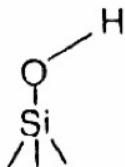
Un tipico adsorbente è la **silice**

- Particle size 2-100 μm
- Pore size 60-4000 \AA
- Surface area 1-500 m^2/g
- pH 2-7.5

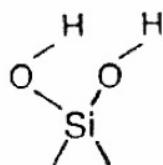
Leggermente acida, può interagire con gruppi polari dell'analita o dell'eluente.

Le proprietà di separazione dipendono dalla disposizione dei gruppi di silanolo

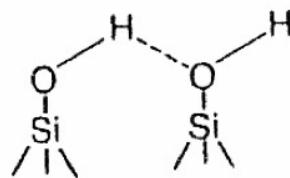
Silica Surface



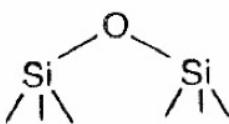
Isolated Single Silanol



Geminal Silanol



Vicinal Silanol



Siloxane

Altre resine utilizzate sono l'**allumina (Al_2O_3)**, e il **carbone**

Nella fase diretta

Fase stazionaria: polare

Fase mobile: solvente organico o miscela meno polare (*i solventi più polari hanno maggiore forza eluente*)

Adatta per separare analiti con scarsa solubilità in solventi acquosi.

Cosa viene eluito per primo?

Gli analiti meno polari

Nella fase inversa

Fase stazionaria: apolare

Fase mobile: più polare (*i solventi meno polari hanno maggiore forza eluente*)

Cosa viene eluito per primo?

Gli analiti polari eluiscono per primi.

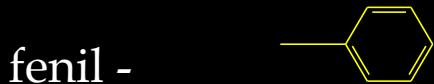
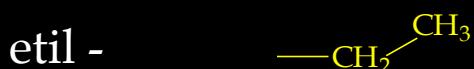
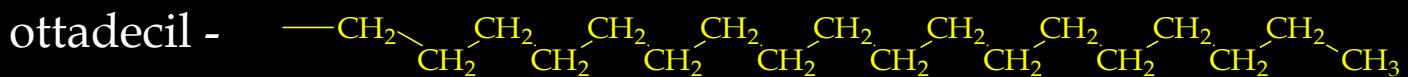
L'eluizione può richiedere un gradiente con proporzioni crescenti di solvente a bassa polarità.

Tabella 3-2: Gruppi funzionali interessati dalla cromatografia di adsorbimento in ordine di polarità crescente.

Gruppo funzionale	Struttura
Metile	- CH ₃
Fluoro	- F
Cloro	- Cl
Nitro	- NO ₂
Aldeide	- CHO
Acetile	- O - C - CH ₃
Ossidrile	- OH
Chetone	- C -
Ammina	- NH ₂
Carbossile	- COOH
Ammide	- NH - C -

Sostituenti utilizzati per modificare la fase stazionaria

I gruppi legati alla silice che più frequentemente vengono utilizzati sono:



A FASE DIRETTA



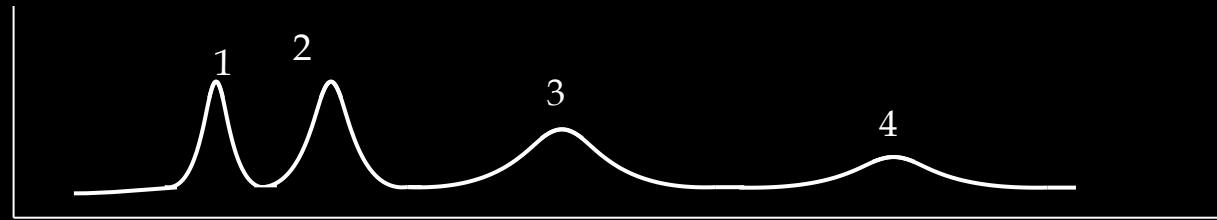
POLARITA'

ELUIZIONE può essere ISOCRATICA

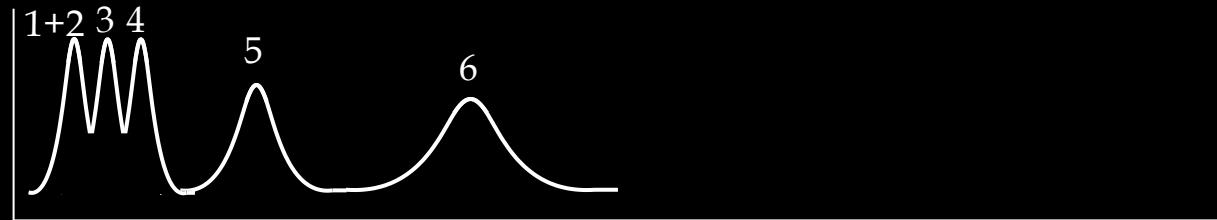
ELUIZIONE può essere in GRADIENTE

EFFETTI DELLA FORZA DEL SOLVENTE SULLA SEPARAZIONE

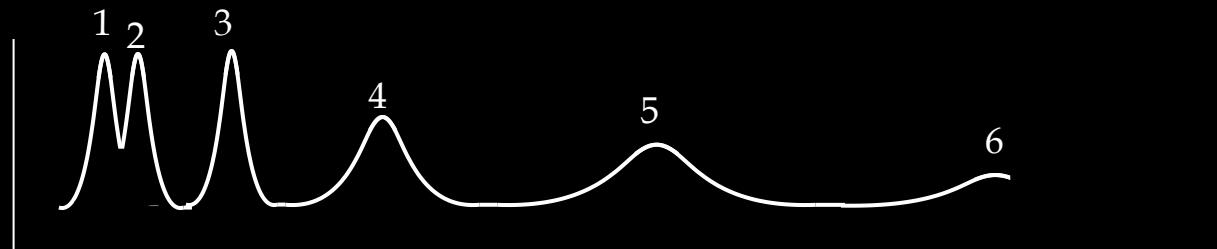
**SOLVENTE
DEBOLE**



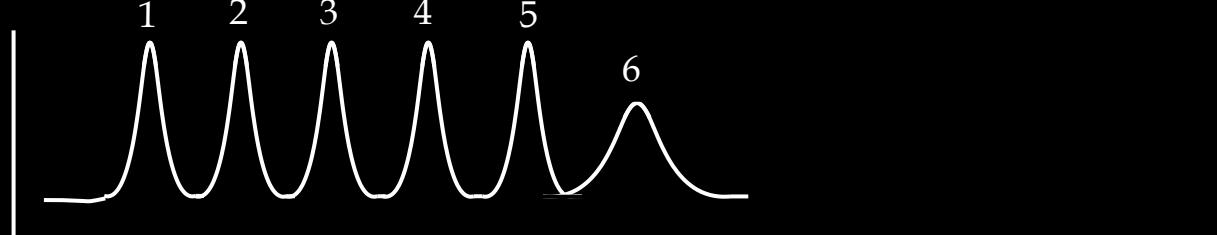
**SOLVENTE
FORTE**



**SOLVENTE
INTERMEDIO**



**GRADIENTE
DI SOLVENTE**



Cromatografia di affinità

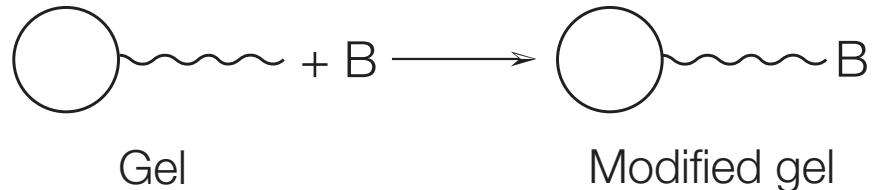
Tale tecnica permette di separare proteine sulla base di un **legame reversibile** tra una proteina e uno specifico ligando agganciato alla matrice cromatografica.

E' caratterizzata **da alta selettività, alta risoluzione e alta capacità** permettendo la purificazione e la concentrazione di proteine anche di 100 volte

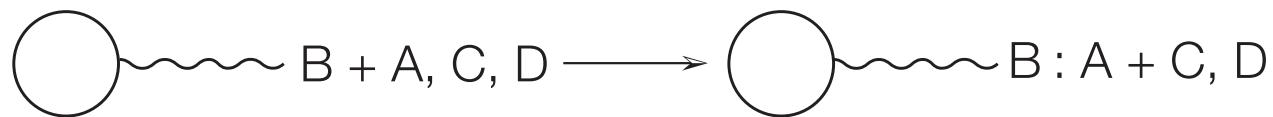
E' l'unica tecnica che permette la purificazione di biomolecole sulla base della loro funzione biologica o sulla sua struttura chimica

Le interazioni tra proteina e ligando sono di natura elettrostatica, interazioni idrofobiche, forze di van der Waals o ponti idrogeno.

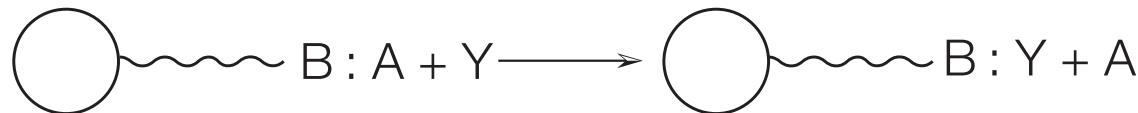
1. Attach ligand B to gel:



2. Pack modified gel into column and adsorb sample containing a mixture of components A, C, and D:



3. Dissociate complex with Y and elute A:



Per eluire la molecole di interesse, l'interazione può essere interrotta :

- Utilizzando un **ligando competitivo**
 - Modificando il **pH**
 - Modificando la **forza ionica o la polarità**
-
- Enzyme \Leftrightarrow substrate analogue, inhibitor, cofactor.
 - Antibody \Leftrightarrow antigen, virus, cell.
 - Lectin \Leftrightarrow polysaccharide, glycoprotein, cell surface receptor, cell.
 - Nucleic acid \Leftrightarrow complementary base sequence, histones, nucleic acid polymerase, nucleic acid binding protein.
 - Hormone, vitamin \Leftrightarrow receptor, carrier protein.
 - Glutathione \Leftrightarrow glutathione-S-transferase or GST fusion proteins.
 - Metal ions \Leftrightarrow Poly (His) fusion proteins, native proteins with histidine, cysteine and/or tryptophan residues on their surfaces.

Table 1. HiTrap and HiPrep™ affinity columns for laboratory scale purification.

Application	HiTrap and HiPrep columns
Isolation of human immunoglobulins	
IgG, fragments and subclasses	HiTrap rProtein A FF, 1 ml and 5 ml
IgG, fragments and subclasses	HiTrap Protein A HP, 1 ml and 5 ml
IgG, fragments and subclasses including human IgG ₃ strong affinity for monoclonal mouse IgG ₁ and rat IgG	HiTrap Protein G HP, 1 ml and 5 ml MAbTrap™ Kit
Avian IgY from egg yolk	HiTrap IgY Purification HP, 5 ml
Mouse and human IgM	HiTrap IgM Purification HP, 1 ml
Purification of fusion proteins	
(His) ₆ fusion proteins	HisTrap™ Kit HiTrap Chelating HP, 1 ml and 5 ml
GST fusion proteins	GSTrap™ FF, 1 ml and 5 ml GSTPrep™ FF 16/10, 20 ml
Other Group Specific Media	
Albumin and nucleotide-requiring enzymes	HiTrap Blue HP, 1 ml and 5 ml
Proteins and peptides with exposed His, Cys or Trp	HiTrap Chelating HP, 1 ml and 5 ml
Biotinylated substances	HiTrap Streptavidin HP, 1 ml
DNA binding proteins and coagulation factors	HiTrap Heparin HP, 1 ml and 5 ml HiPrep 16/10 Heparin FF, 20 ml
Trypsin-like serine proteases including Factor Xa, thrombin and trypsin	HiTrap Benzamidine FF (high sub), 1 ml and 5 ml
Matrix for preparation of affinity media. Coupling via primary amines	HiTrap NHS-activated HP, 1 ml and 5 ml

Table 2. Relative binding strengths of protein A and protein G to various immunoglobulins. No binding: -, relative strength of binding: +, ++, +++, ++++.

Species	Subclass	Protein A binding	Protein G binding
Human	IgA	variable	-
	IgD	-	-
	IgE		
	IgG ₁	++++	++++
	IgG ₂	++++	++++
	IgG ₃	-	++++
	IgG ₄	++++	++++
Avian egg yolk	IgM*	variable	-
	IgY**	-	-
Cow		++	++++
Dog		++	+
Goat		-	++
Guinea pig	IgG ₁	++++	++
	IgG ₂	++++	++
Hamster		+	++
Horse		++	++++
Koala		-	+
Llama		-	+
Monkey (rhesus)		++++	++++
Mouse	IgG ₁	+	++++
	IgG _{2a}	++++	++++
	IgG _{2b}	+++	+++
	IgG ₃	++	+++
	IgM*	variable	-
Pig		+++	+++
Rabbit	no distinction	++++	+++
Rat	IgG ₁	-	+
	IgG _{2a}	-	++++
	IgG _{2b}	-	++
	IgG ₃	+	++
Sheep		+/-	++

* Purify using HiTrap IgM Purification HP columns.

** Purify using HiTrap IgY Purification HP columns.

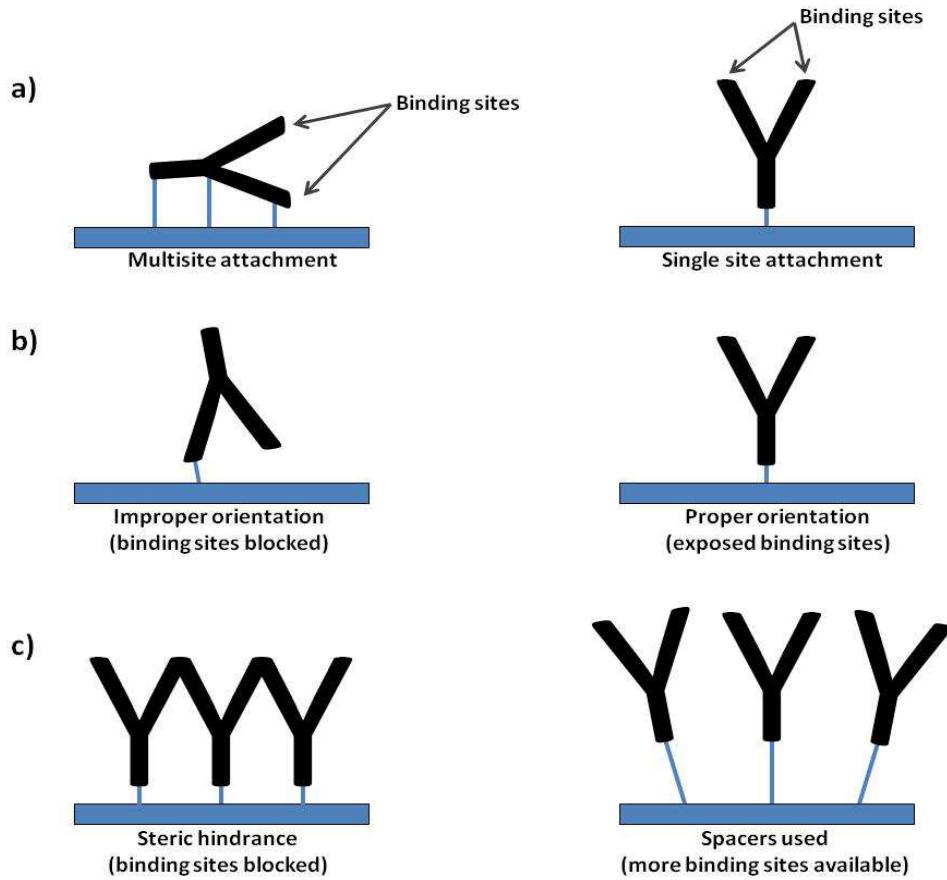


Fig. 8. Potential immobilization problems which can affect affinity ligand activity by a) multi-site attachment, (b) improper orientation, and (c) steric hindrance.

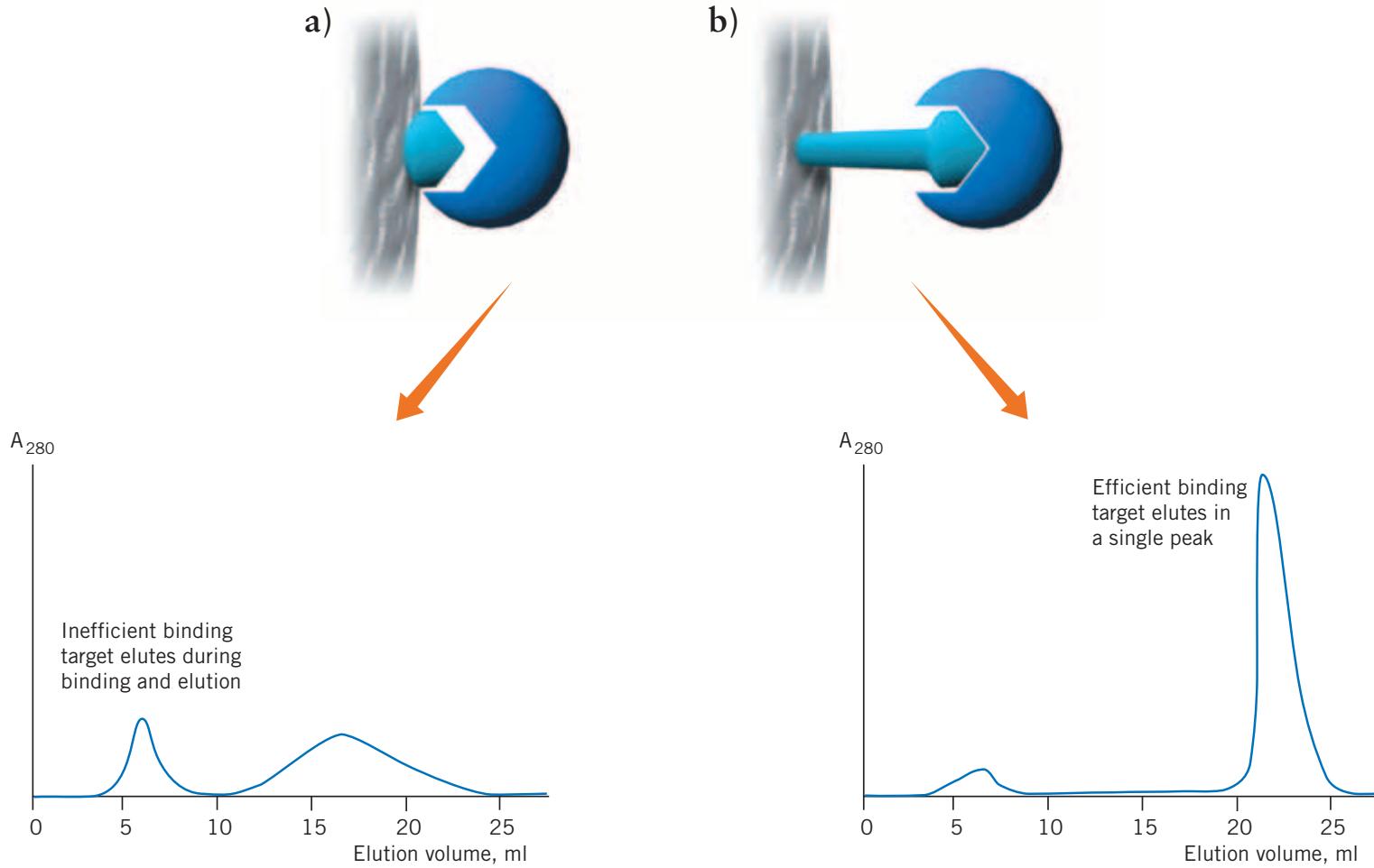
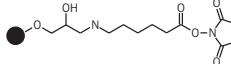
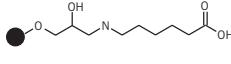
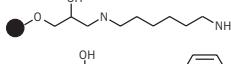
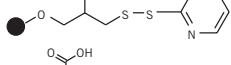
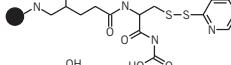
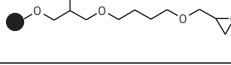
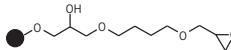
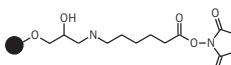
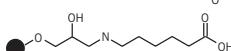
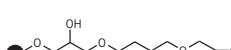
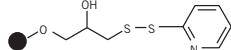


Fig. 56. Using spacer arms. a) Ligand attached directly to the matrix. b) Ligand attached to the matrix via a spacer arm.

Table 8.

Chemical group on ligand	Length of spacer arm	Structure of spacer arm	Product
Proteins, peptides, amino acids			
amino	10-atom		HiTrap NHS-activated HP NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow
	None	-	CNBr-activated Sepharose 4B CNBr-activated Sepharose 4 Fast Flow
	10-atom		ECH Sepharose 4B
carboxyl	11-atom		EAH Sepharose 4B
thiol	4-atom		Thiopropyl Sepharose 6B
	10-atom		Activated Thiol Sepharose 4B
	12-atom		Epoxy-activated Sepharose 6B
Sugars			
hydroxyl	12-atom		Epoxy-activated Sepharose 6B
amino	10-atom		HiTrap NHS-activated HP
	10-atom		ECH Sepharose 4B
	12-atom		Epoxy-activated Sepharose 6B
carboxyl	11-atom		EAH Sepharose 4B
Polynucleotides			
amino	None		CNBr-activated Sepharose 4B CNBr-activated Sepharose 4 Fast Flow
mercurated base	4-atom		Thiopropyl Sepharose 6B
Coenzymes, cofactors, antibiotics, steroids			
amino, carboxyl, thiol or hydroxyl			use matrix with spacer arm (see above)

Lectine usate per la purificazione di glicoproteine

Acronym, Organism and source	Metal ions required	Sugar specificity	Elution conditions	Useful for binding
Con A (<i>Canavalia ensiformis</i> ; jack bean seeds)	Ca ²⁺ , Mn ²⁺	α-Man > α- Glc	0.1–0.5 M α- MeMan	High-Man, hybrid, and biantennary N-linked chains
LCA or LCH (<i>Lens culinaris</i> ; lentil seeds)	Ca ²⁺ , Mn ²⁺	α-Man > α- Glc	0.1–0.5 M α- MeMan	Bi- and triantennary N-linked chains with Fuc α1-6 in core region
PSA (<i>Pisum sativum</i> ; peas)	Ca ²⁺ , Mn ²⁺	α-Man	0.1–0.5 M α- MeMan	Similar to LCA/LCH
WGA (<i>Triticum vulgaris</i> ; wheat germ)	Ca ²⁺ , Mn ²⁺	β-GlcNAc	0.1–0.5 M GlcNAc	GlcNAc- and Sia- terminated chains, or clusters of O-GlcNAc; succinylated form selectively binds GlcNAc>Sia
HPA (<i>Helix promatia</i> ; albumin gland of edible snail)	-	α-GalNAc	0.1–0.5 M GalNAc	Proteins with terminal α- GalNAc or GalNAc-O-Ser/Thr (Tn antigen)
UEA-I (<i>Ulex europaeus</i> ; furze gorse seeds)	-	α-L-Fuc	0.1–0.5 M L- Fuc or methyl-α-L- Fuc	Sugar chains with terminal α- Fuc, especially in α1-2 linkage, but much less with α1-3 or α1-6 linkages
LBA (<i>Phaseolus lunatus</i> ; lima bean)	Mn ²⁺ , Ca ²⁺	Terminal α- GalNAc	0.1–0.5 M GalNAc	Proteins with blood group A structure GalNAcα1-3(Fucα1- 2)Gal-

Table 3. Some examples of lectins used for glycoprotein purification modified from current protocols in protein science.

..applicazioni

Tipologia sulla base di...

HPLC (high pressure liquid chromatography)

E' uno strumento analitico derivato dalla cromatografia classica e si basa sugli stessi principi.

La forza che permette all'eluente di scorrere nella colonna, è rappresentata dalla **pressione** che è applicata da una pompa in testa alla colonna e che forza la fase mobile a scorrere all'interno della fase stazionaria

Processo più rapido ma permette anche di ottenere un maggior numero di piatti teorici il che vuol dire una **migliore risoluzione**.

Sono richieste pressioni di pompaggio di diverse **centinaia di atmosfere**

Tali caratteristiche sono espresse dall'equazione di van Deemter:

Da indicazione del rapporto tra altezza del piatto teorico (HEPT) e velocità di flusso

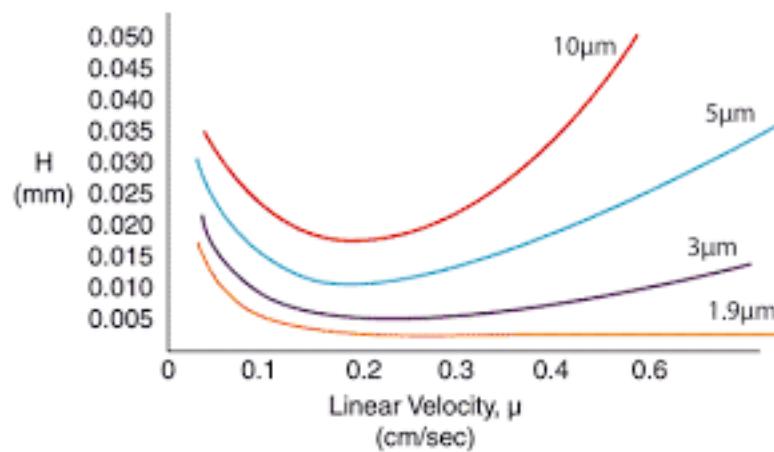
$$H_{EPT} = A + \frac{B}{u} + Cu$$

A = diffusione legata all'impaccamento della colonna

B = dispersione delle molecole eluite lungo il percorso

C = resistenza al trasferimento dell'analita dalla fase mobile alla stazionaria
Resistance to mass transfer coefficient of the analyte between mobile and stationary phase [s]

u = velocità lineare di flusso



- Con una colonna di 25 cm, ID 4 mm e fase stazionaria di 5 μ m, per ottenere un flusso di n-esano di 1mL/min è necessaria una pressione in ingresso di 70 atm
- Ma esistono colonne di 3 cm con ID>1mm e con granulometria di 3 μ m.

Lunghezza: 10-30 cm

Diametri interni: 2-5 mm

Impaccamenti di particelle: 3-10 μm

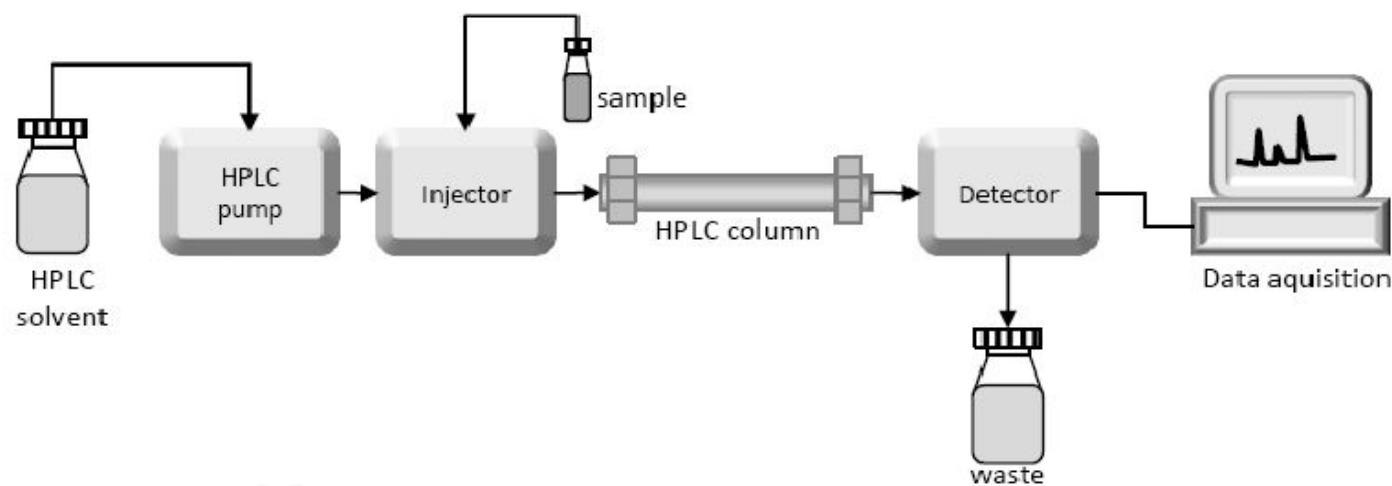
N: 40 000-60 000 piatti teorici per metro

Lunghezza: 3-7,5 cm

Diametri interni: 1-4,6 mm

Impaccamenti di particelle: 3-5 μm

N: fino 100 000 piatti teorici per metro



CARATTERISTICHE DEI RILEVATORI

- Sensibilità adeguata al problema
- Buona stabilità e riproducibilità
- Risposta lineare al soluto, possibilmente per parecchi ordini di grandezza
- Tempi di risposta rapidi
- Risposta verso tutti i soluti, oppure risposta selettiva verso una o più classi di soluti

Rivelatore	LOD (ng)	Selettività	Utilizzabile in gradiente?
Assorbimento UV	0.1–1	selettivo	SI
Indice di rifrazione	100–1000	generale	NO
Fluorescenza	0.001–0.01	selettivo	SI
Elettrochimico	0.01–1	selettivo	NO
Conduttimetrico	0.5–1	selettivo	NO
Assorbimento IR	1000	selettivo	SI
Spettrometro di massa	0.0001–1	generale	SI

GAS CROMATOGRAFIA

- Gas-liquido
 - supporto inerte solido
 - liquido non volatile, legato covalentemente
 - meccanismo di ripartizione
 - moltissime applicazioni

- Gas-solido
 - fasi stazionarie di silice, allumina o carbone
 - meccanismo di adsorbimento
 - adatta per la separazione di gas permanenti (H_2 , He, Ar, O_2 , N_2 , CO) o idrocarburi a basso punto di ebollizione

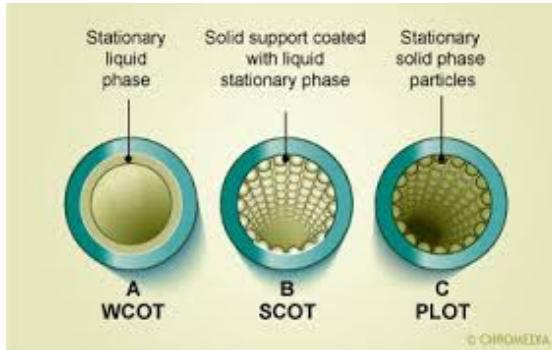
Colonne per gascromatografia

Colonne impaccate

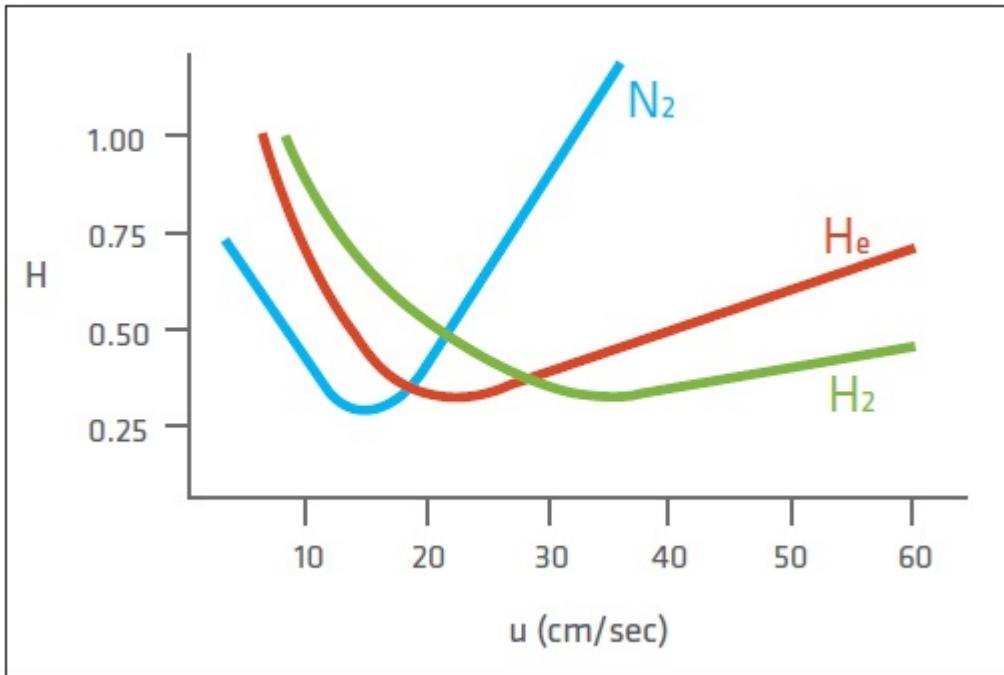
- contengono un supporto solido inerte, finemente suddiviso (comunemente basato su terra di diatomee), ricoperto di fase stazionaria liquida

Colonne capillari

- WCOT (Wall Coated Open Tubular), strato sottile di fase liquida ($1 \mu\text{m}$) depositato sulla superficie
- SCOT (Support Coated Open Tubular), strato poroso creato sulle pareti della colonna per trattamento o deposizione chimica
- PLOT (Porous Layer Open Tubular), strato poroso polimerico o inorganico che funge da fase stazionaria per una cromatografia di adsorbimento



CARRIER GAS



I gas devono essere INERTI
SECCHI e PRIVI di IMPUREZZE

Solamente il 23% delle sostanze puo essere separato per GC

Rilevatori per GC

- a conducibilità termica (TCD)
- a ionizzazione di fiamma (FID)
- a cattura di elettroni (ECD)
- a conducibilità elettrolitica (ELCD)
- amperometrico per lo zolfo (ASD)
- termoionico (TID o NPD)
- fotometrico a fiamma (FPD)
- a fotoionizzazione (PID)
- ad emissione atomica (AED)
- a chemiluminescenza
- spettrometria di massa (MS)

La selezione è basata su:

- natura chimica degli analiti
- potenziali interferenze
- limite di rivelabilità richiesto (LOD)
- disponibilità e/o costo