

# CROMATOGRAFIA

La definizione ufficiale **IUPAC** (Unione Internazionale di Chimica Pura e Applicata) è: “La **cromatografia** è un metodo fisico di separazione nel quale i componenti da separare sono distribuiti tra due fasi, una delle quali è fissa (fase stazionaria), mentre l'altra (fase mobile) si muove in una direzione definita.



**Radice greca:** “*khrômatos*” (colore) e “*graphía*” (tratto da “*grápho*”, scrivere), significa “scritto in colore” o “scrittura col colore”

# CROMATOGRAFIA

La cromatografia indica un insieme di tecniche che servono a separare una miscela nei suoi componenti, con scopi qualitativi e quantitativi.

Queste tecniche sono basate sulla distribuzione differenziale dei vari componenti fra due fasi, una chiamata fase stazionaria e l'altra chiamata fase mobile o eluente, che fluisce in continuo attraverso la fase stazionaria. LE DUE FASI DEVONO ESSERE IMMISCIBILI.



# CROMATOGRAFIA

Scoperta nel 1906 - Mikhail Tswett  
Botanico russo



An EtOH extract of leaf pigments is applied to the column.

EtOH is used to flush the pigments down the column.

A glass column filled with powdered limestone ( $\text{CaCO}_3$ )

Later

A series of colored bands is seen to form, corresponding to the different pigments in the original plant extract. These bands were later determined to be chlorophylls, xanthophylls and carotenoids.

La prima separazione cromatografica, di due pigmenti colorati, su fogli di papiro, risale al 500 a.C., in Egitto: ne parla [Plinio il Vecchio](#) (23-29) nella sua *Historia Naturalis*.

Ma la nascita della tecnica cromatografica viene attribuita al biochimico [Michail Semënovič Cvet](#) (pronunciato e a volte trascritto *Tswett*) nel [1906](#), quando riuscì, con questa tecnica, a separare la [clorofilla](#) da un estratto vegetale. Cvet procedette ponendo una piccola quantità di estratto di foglie verdi alla sommità di una colonna di vetro riempita con particelle di [argilla](#) e lavando successivamente il campione. Fece poi colare, attraverso la colonna, dell'[etere di petrolio](#). A mano a mano che l'etere di petrolio fluiva trascinando con sé il campione, questo si separava in bande di diverso [colore](#) (da qui il nome "cromatografia"), ciascuna delle quali procedeva verso il fondo della colonna con diversa velocità.

Con il suddetto esperimento Cvet mise in evidenza la possibilità di impiegare questo sistema di frazionamento, creando le basi della moderna cromatografia. Il termine si richiama alla separazione di bande di diverso colore e viene ancor oggi utilizzato anche se raramente la separazione si basa sulla differenza cromatica. Questa tecnica è oggi infatti applicata all'[analisi](#) di [sostanze](#) anche incolori, utilizzando il trasferimento tra le fasi con procedimenti più elaborati ed apparecchiature che possono avere notevole complessità.

Con il termine *cromatografia* si indicano in genere tutte le varie tecniche separative, applicabili a miscele di sostanze e basate sulla distribuzione fra due fasi in cui si utilizza uno stesso principio, la diversa velocità con cui i differenti componenti di una miscela migrano in una fase stazionaria sotto l'influenza di una fase mobile, che ha il compito di trascinare lungo il sistema i [soluti](#) che costituiscono la miscela in esame.

# Storia della cromatografia

- La cromatografia fu "riscoperta" da Kuhn nel 1931, quando fu apprezzato il suo significato analitico.
- La cromatografia ha guadagnato molto rapidamente interesse: Kuhn (premio Nobel per la chimica 1938) separa i carotenoidi e le vitamine
- 1937 e 1939: Karrer e Ruzicka, premi Nobel per la chimica
- 1940: consolidata tecnica analitica
- 1948: A. Tiselius, premio Nobel per l'elettroforesi e l'adsorbimento
- 1952: A. J. P. Martin e R. L. M. Synge, premio Nobel per la cromatografia di partizione
- 1950-1960: Golay e Van Deemter stabiliscono la teoria di GC e LC
- 1965: sviluppo di HPLC strumentale



R. Kuhn



A. J. P. Martin



A. Tiselius



R. L. M. Synge

# Esperimento "Splitting the Smartie"



**Carta da filtro  
acqua  
smartie = analita**

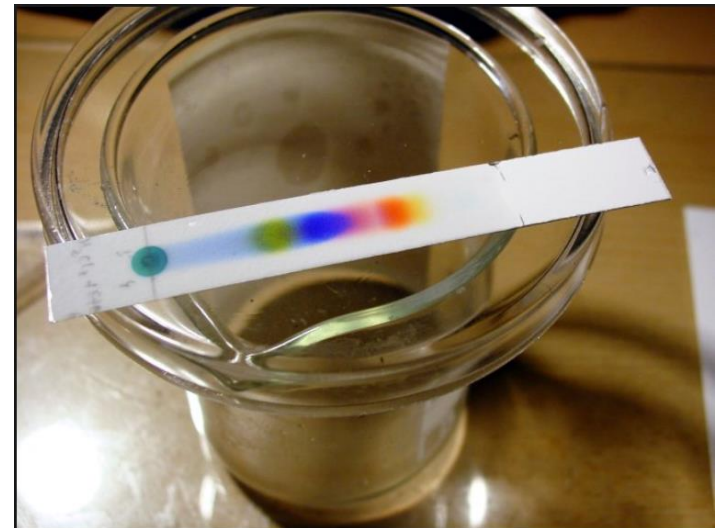
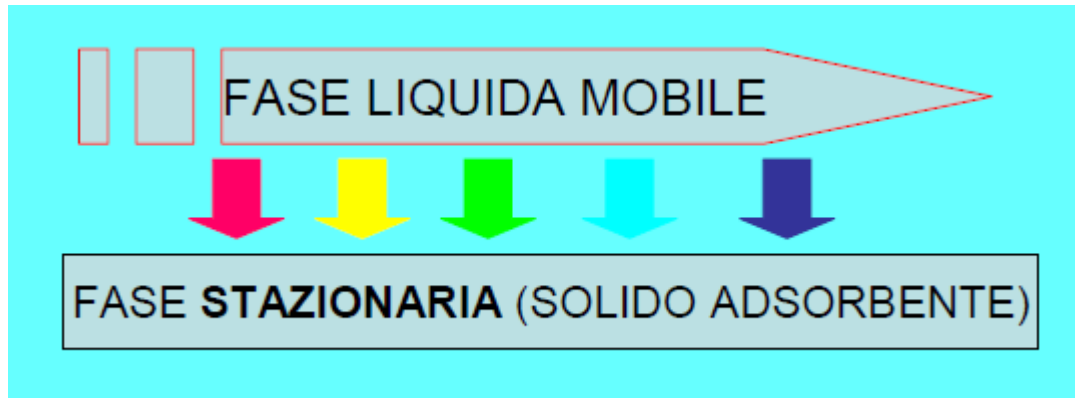


**Fase stazionaria (cellulosa)**

**Fase Mobile (acqua)**

Una cromatografia si basa sul fatto che i vari componenti di una miscela tendono a ripartirsi in modo diverso tra due fasi, in funzione della loro affinità con ciascuna di esse.

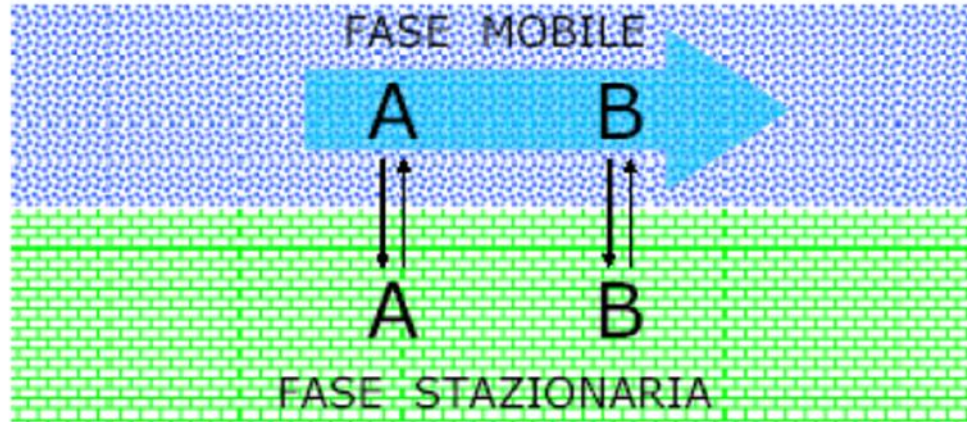
Una fase, un solido o un gel, rimane fissa (fase stazionaria) e un'altra fase, liquida o gassosa (fase mobile) fluisce su di essa trascinando con sé in quantità maggiore i componenti della miscela che più risultano affini a lei.



Separazione mediante cromatografia su strato sottile (TLC) dei componenti di una goccia di inchiostro nero



# SEPARAZIONE DI DUE SOSTANZE MEDIANTE CROMATOGRAFIA



**PRINCIPIO GENERALE:** la fase stazionaria (solida o liquida) di supporto e la fase mobile (liquida o gas). La fase mobile scorre attraverso la fase stazionaria e porta con sé i componenti della miscela. Diversi componenti viaggiano a velocità diverse.



# COEFFICIENTE DI DISTRIBUZIONE

Il principio su cui si basano tutte le tecniche cromatografiche è il

$$\text{Coefficiente di distribuzione o partizione} = \frac{\text{Concentrazione nella fase A}}{\text{Concentrazione nelle fase B}} = K_d$$



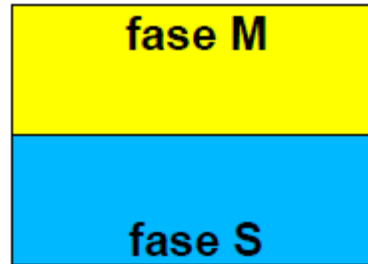
- descrive il modo in cui una sostanza si distribuisce tra due fasi immiscibili
- dipende dalla temperatura

# COEFFICIENTE DI DISTRIBUZIONE

Tutti i sistemi cromatografici hanno due fasi:

**FASE STAZIONARIA**

Solida o liquida



**FASE MOBILE**

liquida o gassosa  
scorre attraverso la fase stazionaria

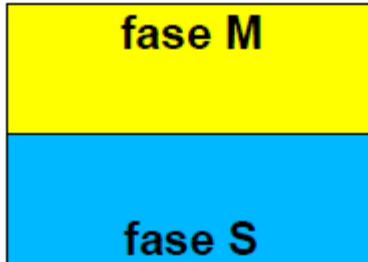
$C_s$

$$K_d = \frac{C_s}{C_m}$$

$C_m$

Le due fasi sono scelte in modo che i composti da separare abbiano differenti coefficienti di distribuzione

# COEFFICIENTE DI DISTRIBUZIONE



Sistema formato da due fasi M ed S in cui viene introdotta una sostanza (analita): **la sostanza si distribuirà fra le due fasi a seconda delle sue particolari proprietà chimico-fisiche.**

$C_m$  e  $C_s$  = concentrazioni nella fase M e nella fase S

$$K_d = \frac{C_s}{C_m}$$

$K_d$  = coefficiente di distribuzione

Dal valore di  $K_d$  dipende il tempo di ritenzione, cioè il tempo impiegato dalla sostanza a percorrere l'intera fase stazionaria. Infatti il tempo che una sostanza trascorre nella colonna dipende dal valore di  $C_s$  rispetto a  $C_m$ .

Se  $C_s \gg C_m$ , la sostanza ha maggiore affinità per Fase S.

Fase M incontrerà una certa difficoltà nel trascinare con sé alcune sostanze, mentre altre, relativamente più affini ad essa e meno verso la Fase S, verranno più facilmente dislocate dalle posizioni che occupano e trasportate più facilmente dalla Fase M, separandosi sempre di più dalle sostanze maggiormente trattenuate.

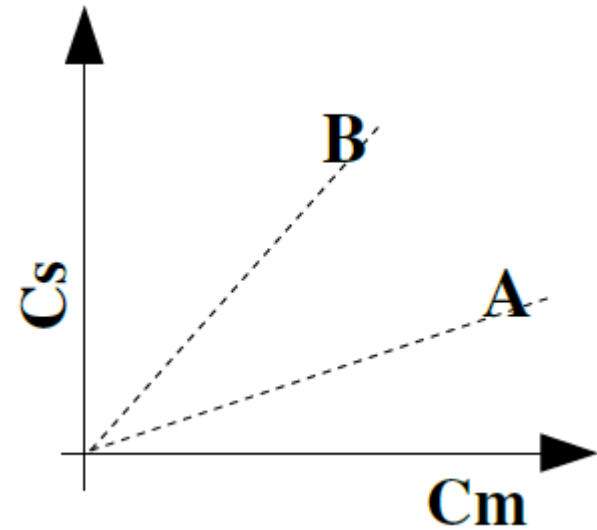
# COEFFICIENTE DI DISTRIBUZIONE

$$K_d = \frac{C_s}{C_m}$$

Nella figura è riportata la retta, detta **isoterma di distribuzione**, di due sostanze A e B per le quali  $K_A < K_B$ .

La sostanza B ha più affinità per la Fase S di quanto ne abbia la sostanza A. Se queste due sostanze A e B percorrono insieme la Fase S, accade che A la lascerà per prima.

***Quanto maggiore è la differenza di  $K_d$  tanto migliore sarà la separazione tra le sostanze.***



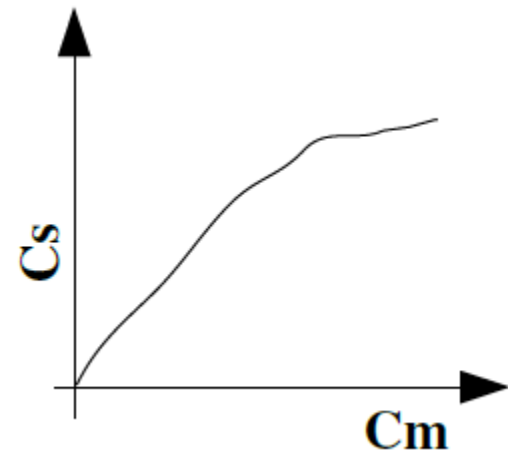
# COEFFICIENTE DI DISTRIBUZIONE

$$K_d = \frac{C_s}{C_m}$$

In pratica le isoterme non hanno l'andamento teorico visto nella diapositiva precedente, ma si presentano come nella figura a destra.

Perché?

Sono trascurati i possibili fenomeni di saturazione della Fase S: se un tratto di Fase S è saturo di sostanza, essa non si potrà più ripartire fra le due Fasi, ma rimarrà nella Fase M, almeno finché incontrerà un tratto di Fase S libero (insaturo). Il comportamento reale è descritto da un'altra equazione (di Langmuir) che non trattiamo.



# **CLASSIFICAZIONE DELLE TECNICHE CROMATOGRAFICHE**



- **STATO FISICO DELLA FASE MOBILE**
- **FORMA DEL SUPPORTO CROMATOGRAFICO**
- **MECCANISMO DI SEPARAZIONE**



# STATO FISICO DELLA FASE MOBILE



In base allo stato fisico della fase mobile possiamo così classificare le tecniche cromatografiche:

- **Cromatografia Liquida:** la fase mobile è un liquido nel quale siano solubili i componenti della miscela da separare; la fase stazionaria deve essere insolubile nella fase mobile.
- **Gascromatografia:** la fase mobile è un gas che funge da trasportatore per i componenti della miscela
- **Cromatografia fluida supercritica:** la fase mobile è un fluido supercritico, con proprietà intermedie fra un liquido e un gas.

# FORMA DEL SUPPORTO CROMATOGRAFICO



In base alla forma del supporto (letto) cromatografico su cui avviene la separazione possiamo distinguere:

- **CROMATOGRAFIA SU COLONNA:** la fase stazionaria è contenuta all'interno di una colonna cilindrica. La fase può riempire completamente la colonna o rivestire la superficie interna
- **CROMATOGRAFIA PLANARE:** : la fase stazionaria è distribuita su una superficie piana, che può essere un supporto cartaceo (CROMATOGRAFIA SU CARTA) o una lastra di vetro, plastica o metallo (CROMATOGRAFIA SU STRATO SOTTILE)

# MECCANISMI DELLA SEPARAZIONE



In base ai tipi di interazione molecolare fra l'analita e le due fasi (M ed S) possiamo suddividere i meccanismi di separazione impiegati in cromatografia in:

- **ADSORBIMENTO**
- **RIPARTIZIONE**
- **SCAMBIO IONICO**
- **ESCLUSIONE**
- **AFFINITÀ**

# TECNICHE CROMATOGRAFICHE



## In base alla forma del letto cromatografico

- Cromatografia su colonna
- Cromatografia planare

## In base allo stato fisico della fase mobile

- Cromatografia liquida
- Gascromatografia
- Cromatografia fluida supercritica

## In base al meccanismo di separazione

- Adsorbimento
- Ripartizione
- Scambio ionico
- Esclusione
- Affinità

# INTERAZIONE SOLUTO-FASI



Le interazioni che si verificano tra le sostanze da separare e le due fasi (mobile e stazionaria) sono deboli: se così non fosse non ci sarebbe trattenimento sulla fase stazionaria oppure, al contrario, eluizione.

Sono sfruttate a scopo separativo le seguenti interazioni:

- legami a idrogeno
- Forze di Van der Waals (interazioni dipolo-dipolo)
- Formazione di composti di interazione
- Attrazione coulombiana (legami ionici)
- Interazioni steriche

In tutte queste interazioni svolge un ruolo solitamente decisivo la polarità delle due fasi. Spesso possono essere presenti più tipi di interazione nello stesso processo cromatografico.

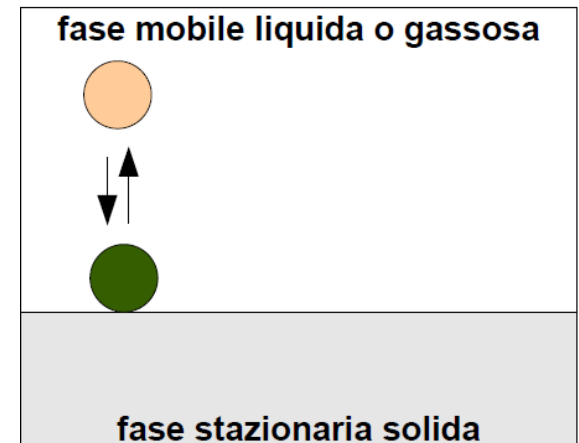
# CROMATOGRAFIA DI ADSORBIMENTO

La fase stazionaria è un solido. Si basa sul fatto che alcuni materiali solidi hanno la capacità di trattenere le molecole alla loro superficie - sono coinvolte forze di interazione deboli, quali forze di Van der Waals e legami a idrogeno.

I diversi analiti si ripartiscono tra fase mobile e fase stazionaria (adsorbente) in modo diverso a seconda delle relative forze di interazione. Queste dipendono dalla natura chimica dell'adsorbente, della fase mobile e degli analiti.

La forza di legame di un analita dipende da specifici gruppi funzionali (OH e aromatici aumentano le interazioni).

Un tipico adsorbente è la **silice**, che presenta gruppi silanolo (Si-OH). Altri adsorbenti comunemente usati sono **allumina** e **carbone**. La cromatografia di adsorbimento può essere condotta sia su strato sottile che su colonna (FPLC e HPLC). È il metodo più comunemente usato per la separazione di composti non ionici, insolubili in acqua, quali trigliceridi, vitamine, vari farmaci.

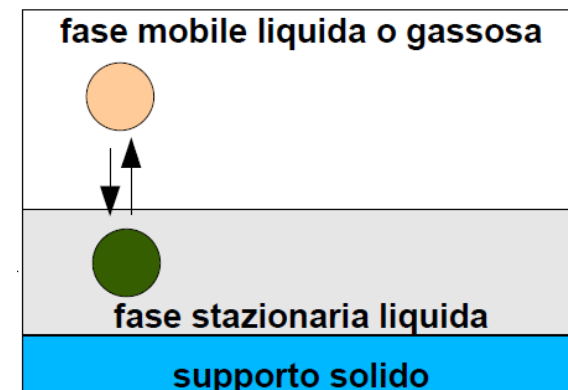




# CROMATOGRAFIA DI RIPARTIZIONE

La fase stazionaria è un liquido che impregna un solido granulare inerte o è ad esso chimicamente legato; in questo liquido le molecole da separare sono solubili; la fase stazionaria e la fase mobile devono invece essere immiscibili. Durante l'eluizione le molecole si ripartiscono dinamicamente tra le due fasi secondo la diversa solubilità di ognuna. Si parla quindi di cromatografia di ripartizione, che può essere gas-liquido o liquido-liquido a seconda della natura della fase mobile. Le due tecniche che ad oggi sfruttano il principio della ripartizione sono la gascromatografia e la cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC). Il fenomeno della ripartizione viene sfruttato per la separazione in colonna degli analiti, che a seconda delle caratteristiche chimico fisiche si legheranno più o meno stabilmente alla fase stazionaria e quindi avranno diverso tempo di ritenzione.

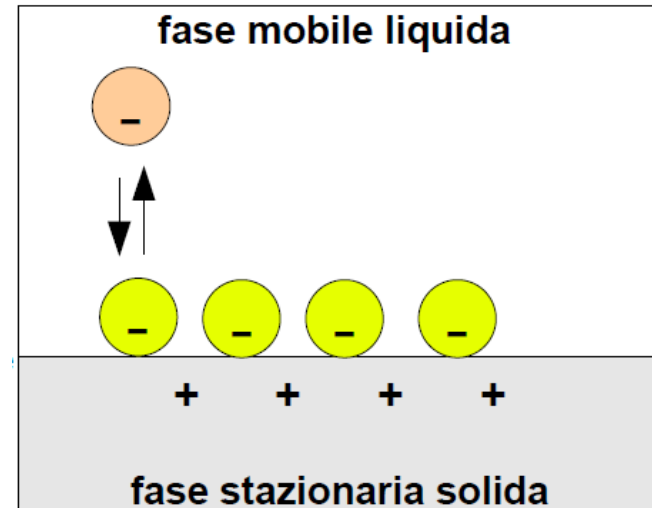
La cromatografia di ripartizione è chiamata in fase normale se la fase stazionaria è più polare della fase mobile, mentre è chiamata fase inversa se la fase stazionaria è meno polare della fase mobile. Si tratta della tecnica più comunemente impiegata per la separazione di sostanze organiche.



# CROMATOGRAFIA A SCAMBIO IONICO

La fase stazionaria è costituita da una resina a scambio ionico (polimero inerte) contenente siti attivi ionizzati o ionizzabili, i cui contro-ioni possono essere scambiati con altri ioni aventi carica dello stesso segno. L'analita ha carica opposta alla fase stazionaria e dello stesso segno dei contro-ioni. Il meccanismo di separazione è basato sulla competizione per i siti di scambio tra gli ioni presenti nella fase mobile e quelli presenti nel campione. Quanto più è forte la carica del campione, tanto più verrà trattenuto all'interno della colonna. La fase mobile è una soluzione tampone acquosa in cui il pH e la concentrazione vengono regolati per controllare il tempo di eluizione degli analiti. Si parla di cromatografia di scambio ionico (IEC).

La cromatografia a scambio ionico è impiegata per la separazione di sostanze ioniche o ionizzabili.



# CROMATOGRAFIA A SCAMBIO IONICO



La maggior parte delle resine a scambio ionico è basata sulla copolimerizzazione dello stirene e di un agente reticolante, divinilbenzene (DVB), per produrre una struttura reticolata in 3-D, per lo più fornita sotto forma di perline sferiche.

Il **grado di reticolazione** nelle resine a scambio ionico è variabile ed è scelto in funzione delle caratteristiche che deve presentare lo scambiatore.

**Resine con alto grado di reticolazione:** rigide e poco porose, lente nel raggiungere l'equilibrio, anche se la selettività e la capacità sono maggiori rispetto alle resine con basso grado di reticolazione

**Resine a basso contenuto di legami crociati** (dette anche macroporose): più permeabili, meno rigide più veloci ad equilibrarsi, ma si rigonfiano d'acqua.

# CROMATOGRAFIA A SCAMBIO IONICO



Alternativa alle resine polistireniche

**Carbossimetil-cellulosa (CM-cellulosa)**

**Di-etil-ammino-etil cellulosa (DEAE-cellulosa)**

**Derivati del destrano (Sephadex) e dell'agarosio Sepharose):** sono correlati ai materiali usati nella cromatografia di esclusione. Uniscono il processo di scambio ionico a quello di filtrazione molecolare, migliorando la risoluzione complessiva

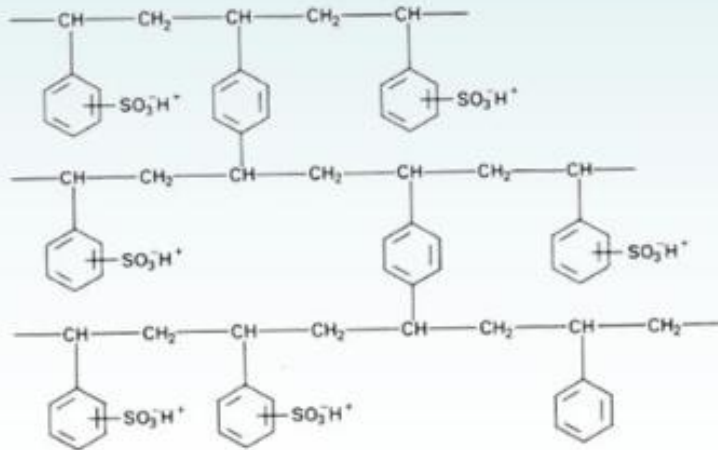
# Tipi di Resine

La comune definizione delle resine ioniche è fatta sulla base della acidità del loro gruppo attivo

**Ampio** intervallo di pH di utilizzo

	Cationico	Anionico
Forte	$-\text{SO}_3^- \text{H}^+$	$-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3 \text{OH}^-$
Debole	$-\text{COO}^- \text{H}^+$	$-\text{N}^+\text{H}_3 \text{OH}^-$

**Ridotto** intervallo di pH di utilizzo



L'**affinità** maggiore per la fase resina è per ioni:

- a carica elevata,
- a piccolo raggio di idratazione,
- molto polarizzabili (polarizzabilità è capacità della nuvola elettronica di uno ione a venire deformata da cariche vicine e a formare un dipolo).



Resina a scambio ionico

## Altri tipi di matrici

RESINA	SUPPORTO	GRUPPO FUNZIONALE	TIPO
DEAE Sepharose (Pharmacia) DEAE Bio-Gel A (Bio- Rad)	<b>Agarosio</b>	$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+\text{H}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$ diethylamminoetil  (DEAE)	Scambio anionico (debole)
QAE Sephadex C50 (Pharmacia)	<b>Destrano</b>	Dietil-(2-idrossipropil) amminoetil (un ammina quaternaria)	Scambio anionico (forte)
CM Sepharose (Pharmacia)	<b>Agarosio</b>	$-\text{CH}_2\text{COO}-$ Carbossimetil	Scambio cationico (debole)
SP Sephadex C50 (Pharmacia)	<b>Agarosio</b>	$-(\text{CH}_2)_3\text{SO}_3^-$ Sulfopropil	Scambio cationico (forte)



# CROMATOGRAFIA A SCAMBIO IONICO



Il meccanismo di scambio ionico si compone di 5 fasi:

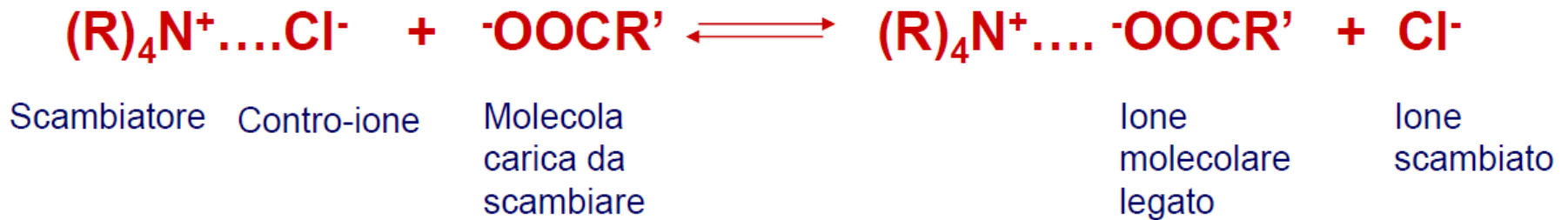
1. Diffusione dello ione alla superficie della resina. Di solito avviene molto velocemente
2. Diffusione dello ione attraverso la matrice della resina verso il sito di scambio. Dipende dal grado di legami crociati presenti nella resina e dalla concentrazione della soluzione
3. Scambio di ioni al sito di scambio. E' un processo all'equilibrio. Quanto maggiore è la carica della molecola da scambiare, tanto più forte è il legame con la resina e tanto meno facilmente essa può essere sostituita da altri ioni
4. Diffusione del controione attraverso la resina
5. Distacco selettivo dell'analita per mezzo di un eluente. L'eluizione selettiva si ottiene variando il pH o la forza ionica o entrambi, o per affinità. In quest'ultimo caso viene introdotto nel sistema uno ione che ha maggior affinità per la resina rispetto all'analita.

# EQUILIBRI DI SCAMBIO IONICO

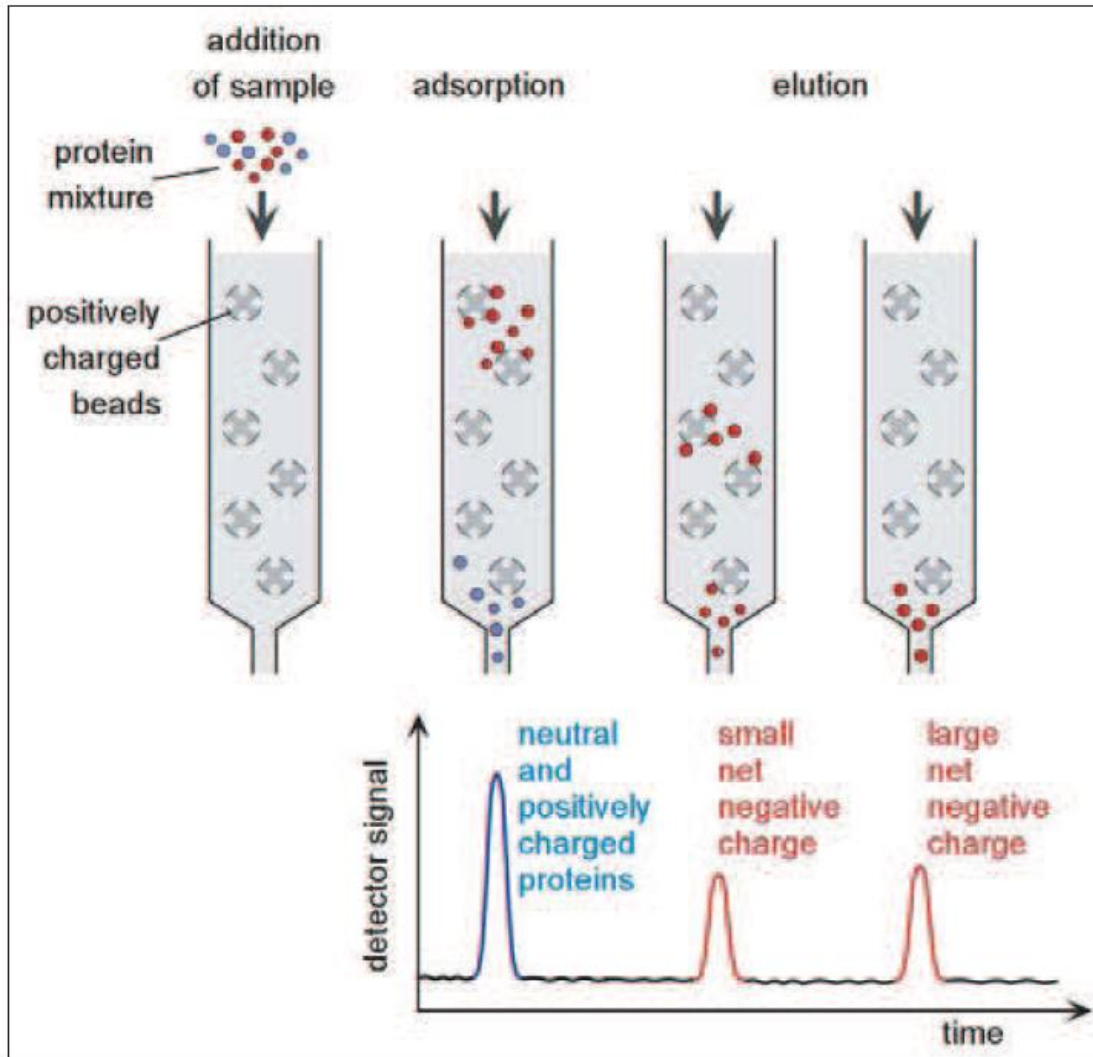
## Scambiatore cationico



## Scambiatore anionico

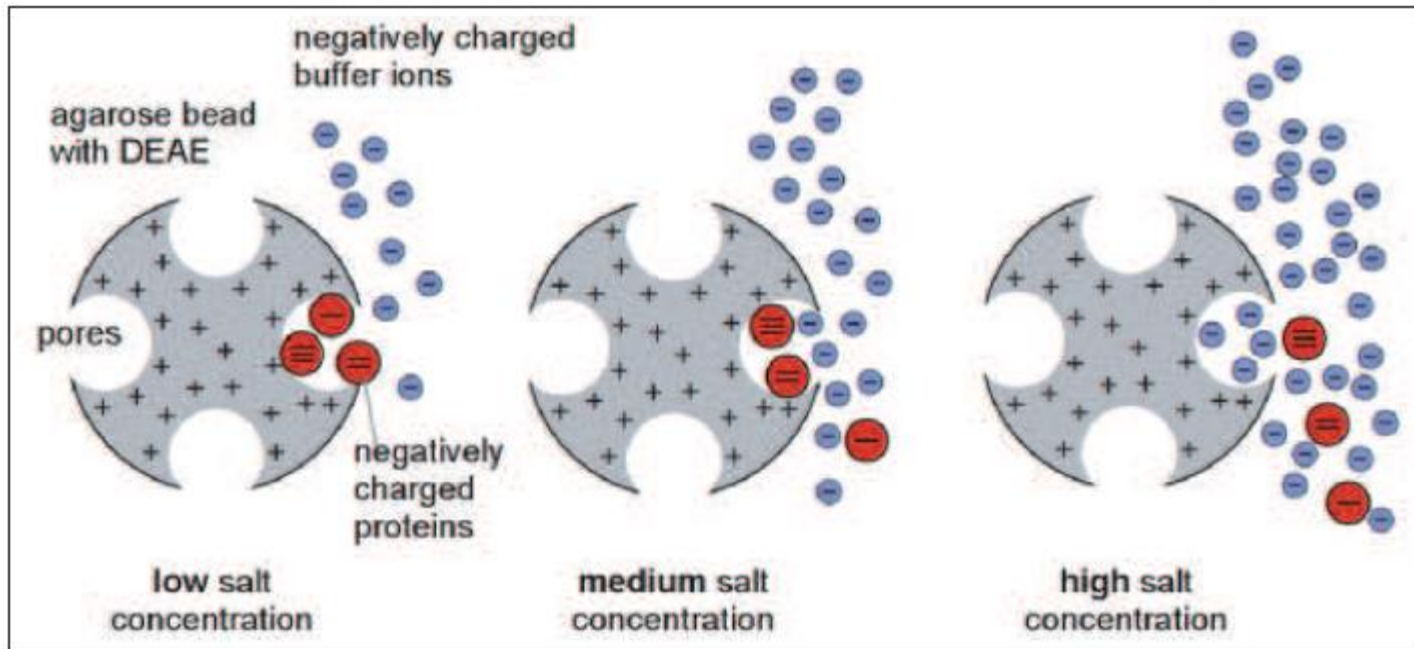


# CROMATOGRAFIA A SCAMBIO IONICO



Principio della cromatografia a scambio ionico. I componenti del campione carichi negativamente sono adsorbiti sulla fase stazionaria e quindi separati sia da quelli carichi positivamente che non carichi. I componenti adsorbiti vengono quindi eluiti aumentando la forza ionica della fase mobile.

# CROMATOGRAFIA A SCAMBIO IONICO



Il desorbimento degli analiti carichi negativamente da uno scambiatore di anioni avviene, per esempio, aumentando la concentrazione di sale. Gli analiti con una carica netta bassa vengono eluiti a concentrazione salina media, mentre gli analiti con una carica netta elevata richiedono una fase mobile con una elevata forza ionica prima di essere eluiti.

# CROMATOGRAFIA A SCAMBIO IONICO



## APPLICAZIONI

Separazione di amminoacidi

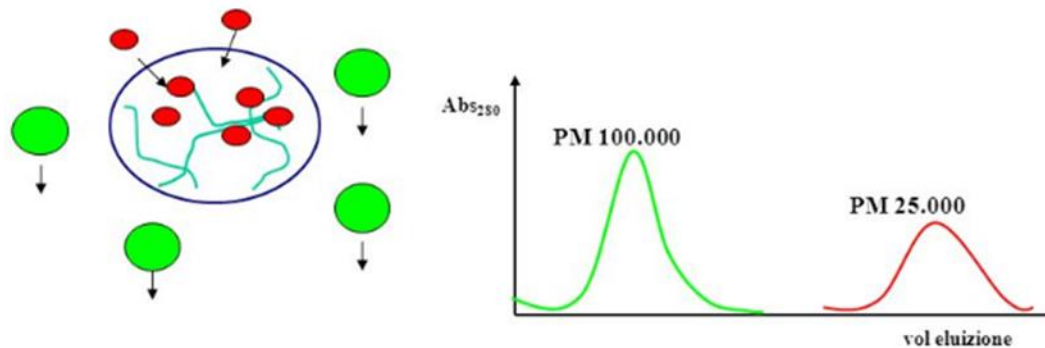
Separazione di proteine

Separazione di acidi nucleici

# CROMATOGRAFIA DI ESCLUSIONE DIMENSIONALE

La fase stazionaria è un solido poroso o un gel. Le molecole dell'analita, disciolte nella fase mobile, penetrano nei pori se le loro dimensioni sono compatibili e vi rimangono per un certo tempo; le molecole più grandi sono invece escluse dai pori ed escono dalla colonna in tempi brevi. Si parla di cromatografia di esclusione dimensionale (SEC) con le varianti Gel permeazione per la separazione di sostanze insolubili in acqua e Gel filtrazione per la separazione di sostanze solubili in acqua. La tecnica è impiegata per la separazione di miscele di molecole di dimensioni diverse fra loro.

- ♦ Le molecole grandi non possono entrare e restano nel volume escluso.
- ♦ Le molecole piccole entrano nei pori e sono ritardate nella colonna.



# CROMATOGRAFIA DI ESCLUSIONE DIMENSIONALE



Per ciascun tipo di gel la distribuzione di un soluto tra il solvente interno alla particella di gel e quello esterno è definito dal

**Coefficiente di distribuzione  $K_d$** , funzione della massa molecolare

$K_d = 0$  la molecola del soluto è grande e completamente esclusa dal solvente interno al gel

$K_d = 1$  la molecola di soluto è permeabile alle particelle di gel

$0 < K_d < 1$  variabilità nella porosità delle particelle e di conseguenze una parte del solvente interno sarà accessibile e una parte no.

La variabilità di  $K_d$  rende possibile la separazione.

# CROMATOGRAFIA DI ESCLUSIONE DIMENSIONALE

Il Volume di eluizione di un soluto  $V_e$  dipende da:

1. Volume esterno alle particelle di gel,  $V_o$  o volume vuoto
2. Il coefficiente di distribuzione  $K_d$
3. Il volume interno alle particelle di gel  $V_i$

$$V_e = V_o + K_d V_i$$

$V_i = a W_r$  dove  $a$  = peso secco del gel e  $W_r$  = coefficiente di rigonfiamento

$V_e$  per ciascun soluto varia con la lunghezza della colonna

$K_d$  è un valore costante, caratteristico per ogni soluto

Per due composti di diversa massa molecolare e con diversa  $K_d$  ( $K_d'$  e  $K_d''$ ), la differenza tra i  $V$  di eluizione,  $V_s$ , è:

$$V_s = V_{e'} - V_{e''} = (V_o + K_d' V_i) - (V_o + K_d'' V_i) = (K_d' - K_d'') V_i$$

Per ottenere una completa separazione di due composti, il volume del campione applicato non dovrà essere  $>$  di  $V_s$ . In pratica è opportuno ridurre il  $V$  del campione che viene caricato



# CROMATOGRAFIA DI ESCLUSIONE DIMENSIONALE



Gel utilizzati:

Polimeri legati fra loro con legami crociati. Variando la percentuale di legami crociati vengono formati pori di dimensioni variabili.

Destrani (Sephadex)

Agarosio (Sepharose)

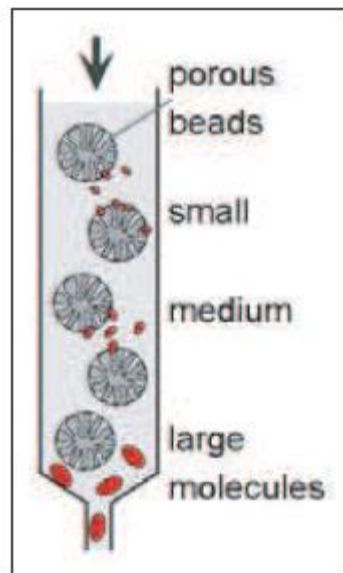
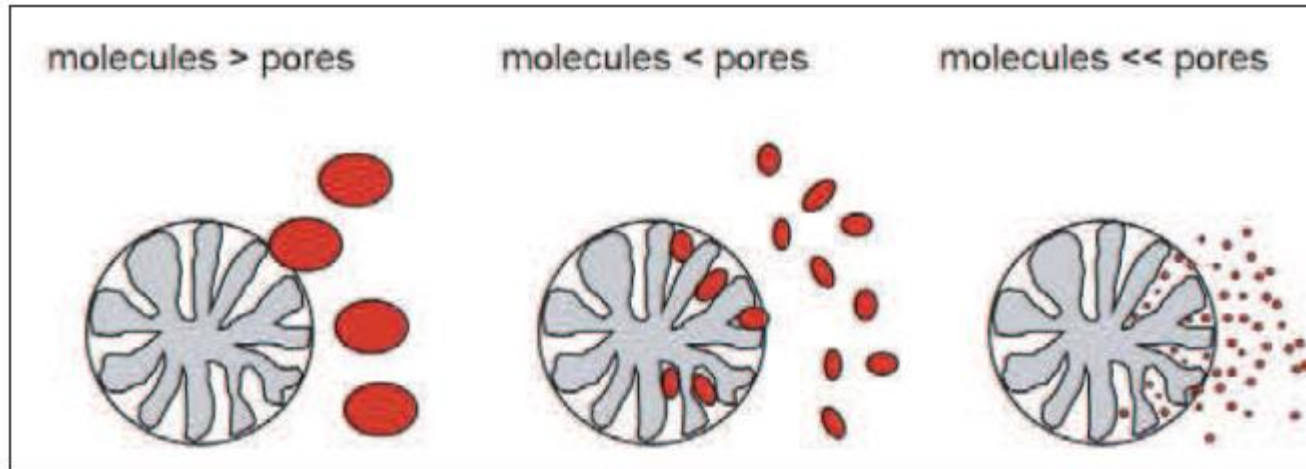
Poliacrilammide (Biogel P)

# CROMATOGRAFIA DI ESCLUSIONE DIMENSIONALE

## Properties of Bio-Gel P-Gels

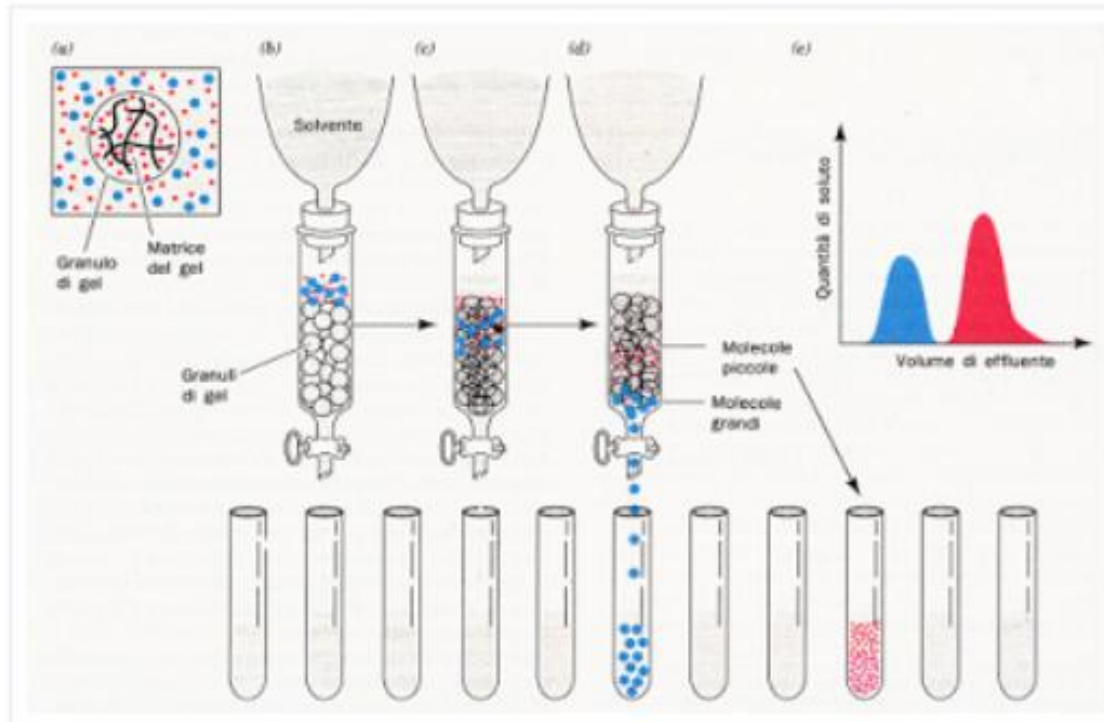
<b>Gel</b>	<b>Particle Size Range, Hydrated Beads (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>Typical Hydrated Bed Volume, ml/g of Dry Gel</b>	<b>Typical Flow Rates (cm/hr)*</b>	<b>Typical Fractionation Range/Nominal Exclusion Limit (Daltons)**, †</b>
Bio-Gel P-2 Gel, Fine	45-90	3	5.0-10	100-1,800
Bio-Gel P-2 Gel, Extra Fine	< 45		<10	100-1,800
Bio-Gel P-4 Gel, Medium	90-180	4	15-20	800-4,000
Bio-Gel P-4 Gel, Fine	45-90		10.0-15	800-4,000
Bio-Gel P-4 Gel, Extra Fine	< 45		<10	800-4,000
Bio-Gel P-6 Gel, Medium	90-180	6.5	15-20	1,000-6,000
Bio-Gel P-6 Gel, Fine	45-90		10.0-15	1,000-6,000
Bio-Gel P-6 Gel, Extra Fine	< 45		<10	1,000-6,000
Bio-Gel P-6DG Gel	90-180	6.5	15-20	1,000-6,000
Bio-Gel P-10 Gel, Medium	90-180	7.5	15-20	1,500-20,000
Bio-Gel P-10 Gel, Fine	45-90		10.0-15	1,500-20,000
Bio-Gel P-30 Gel, Medium	90-180	9	7.0-13	2,500-40,000
Bio-Gel P-30 Gel, Fine	45-90		6.0-11	2,500-40,000
Bio-Gel P-60 Gel, Medium	90-180	11	4.0-6	3,000-60,000
Bio-Gel P-60 Gel, Fine	45-90		3.0-5	3,000-60,000
Bio-Gel P-100 Gel, Medium	90-180	12	4.0-6	5,000-100,000
Bio-Gel P-100 Gel, Fine	45-90		3.0-5	5,000-100,000

# CROMATOGRAFIA DI ESCLUSIONE DIMENSIONALE

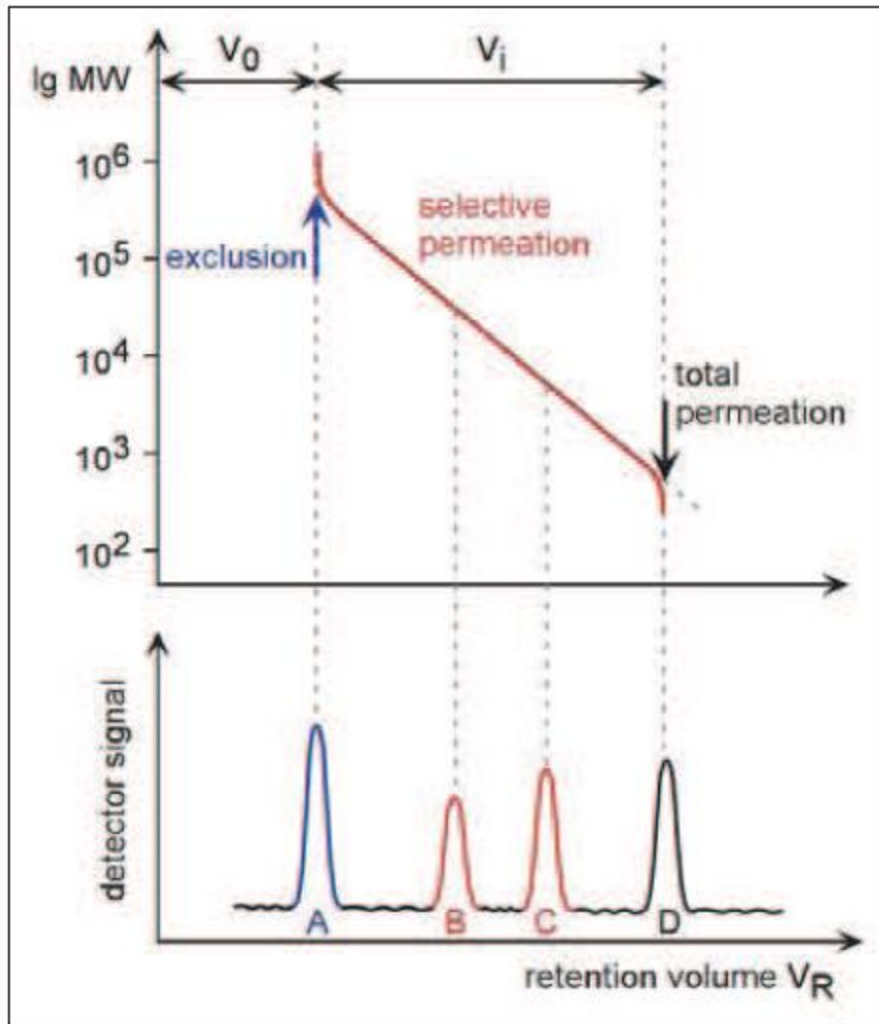


Le molecole grandi non entrano nei pori e passano attraverso la Fase S senza essere trattenute; molecole molto piccole trascorrono molto tempo nella Fase S. Solo entro una dimensione critica esiste una relazione tra tempo di permanenza e dimensione molecolare, che può essere utilizzata per separazione.

# CROMATOGRAFIA DI ESCLUSIONE DIMENSIONALE



# CROMATOGRAFIA DI ESCLUSIONE DIMENSIONALE



Le molecole vengono ritardate selettivamente se la loro massa molecolare (volume idrodinamico) è compresa tra il limite di esclusione e il limite di permeazione totale

# CROMATOGRAFIA DI ESCLUSIONE DIMENSIONALE

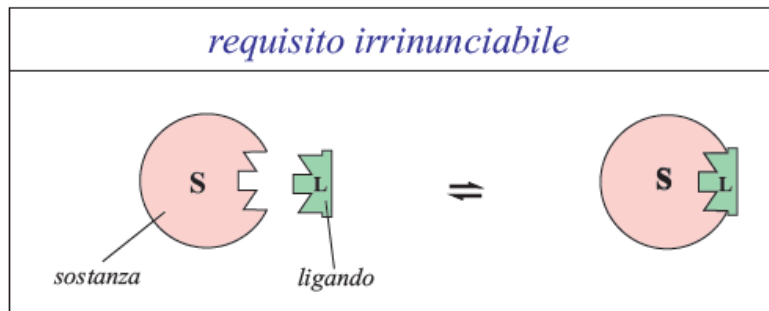


## APPLICAZIONI

1. Purificazione di molecole biologiche
2. Determinazione della massa molecolare: i  $V_e$  dipendono dalla massa molecolare. In un certo intervallo di massa molecolare,  $V_e$  è una funzione lineare del log della massa molecolare
3. Concentrazione di una soluzione, per aggiunta di resina secca con pori molto piccoli
4. Dissalazione

# CROMATOGRAFIA DI AFFINITÀ

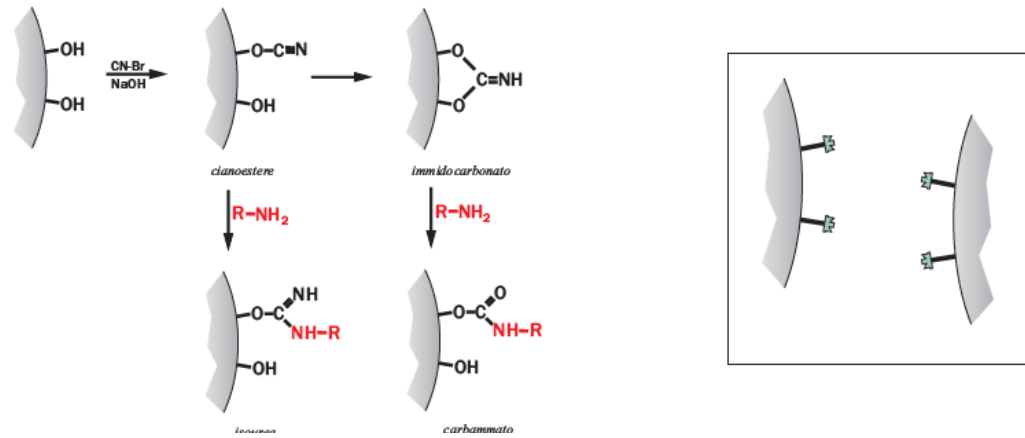
In questo caso la fase stazionaria è una matrice inerte su cui è legato covalentemente il ligando, mentre la fase mobile è una soluzione salina acquosa. Questo tipo di cromatografia sfrutta la elevata specificità con cui le biomolecole si riconoscono. Vengono utilizzate reazioni di tipo biochimico, reversibili e molto specifiche, in modo che le molecole da separare interagiscano con la fase stazionaria e si ottenga così l'eluizione selettiva di alcuni componenti della miscela. La cromatografia di affinità è impiegata nella separazione di molecole di interesse prevalentemente biochimico.



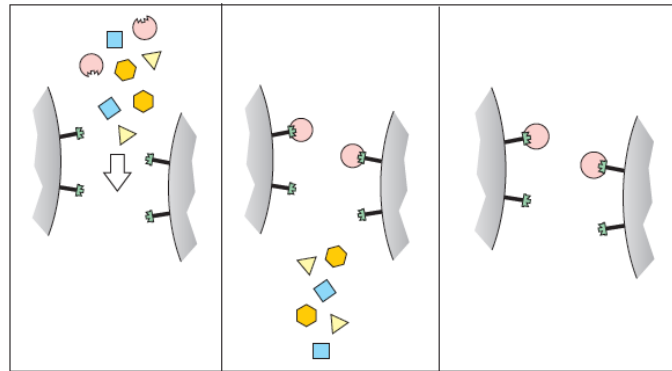
alcune eccellenti separazioni cromatografiche di affinità

<b>avidina</b>	<i>enzimi contenenti biotina</i>
<b>acidi grassi</b>	<i>proteine che legano acidi grassi</i>
<b>eparina</b>	<i>fattori della coagulazione, recettori ormonali</i>
<b>lectine</b>	<i>glicoproteine</i>
<b>poli-A</b>	<i>RNA</i>
<b>anticorpi</b>	<i>proteine antigeniche</i>

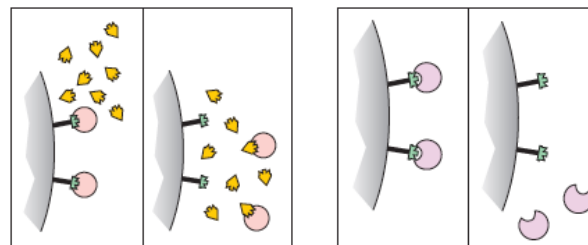
1) preparare la fase stazionaria, fissando il ligando alla matrice



2) applicare il campione e lavare via le altre sostanze



3) rimuovere la sostanza dalla fase stazionaria





# MATRICI PER CROMATOGRAFIA DI AFFINITA'



- deve contenere gruppi reattivi numerosi e adatti a legare covalentemente il ligando e deve risultare stabile nelle condizioni in cui avviene tale attacco;
- deve essere stabile nelle condizioni di interazione della macromolecola e nella successiva eluizione;
- non deve interagire, se non debolmente, con altre macromolecole, per evitare un adsorbimento aspecifico;
- deve possedere buone capacità di flusso.

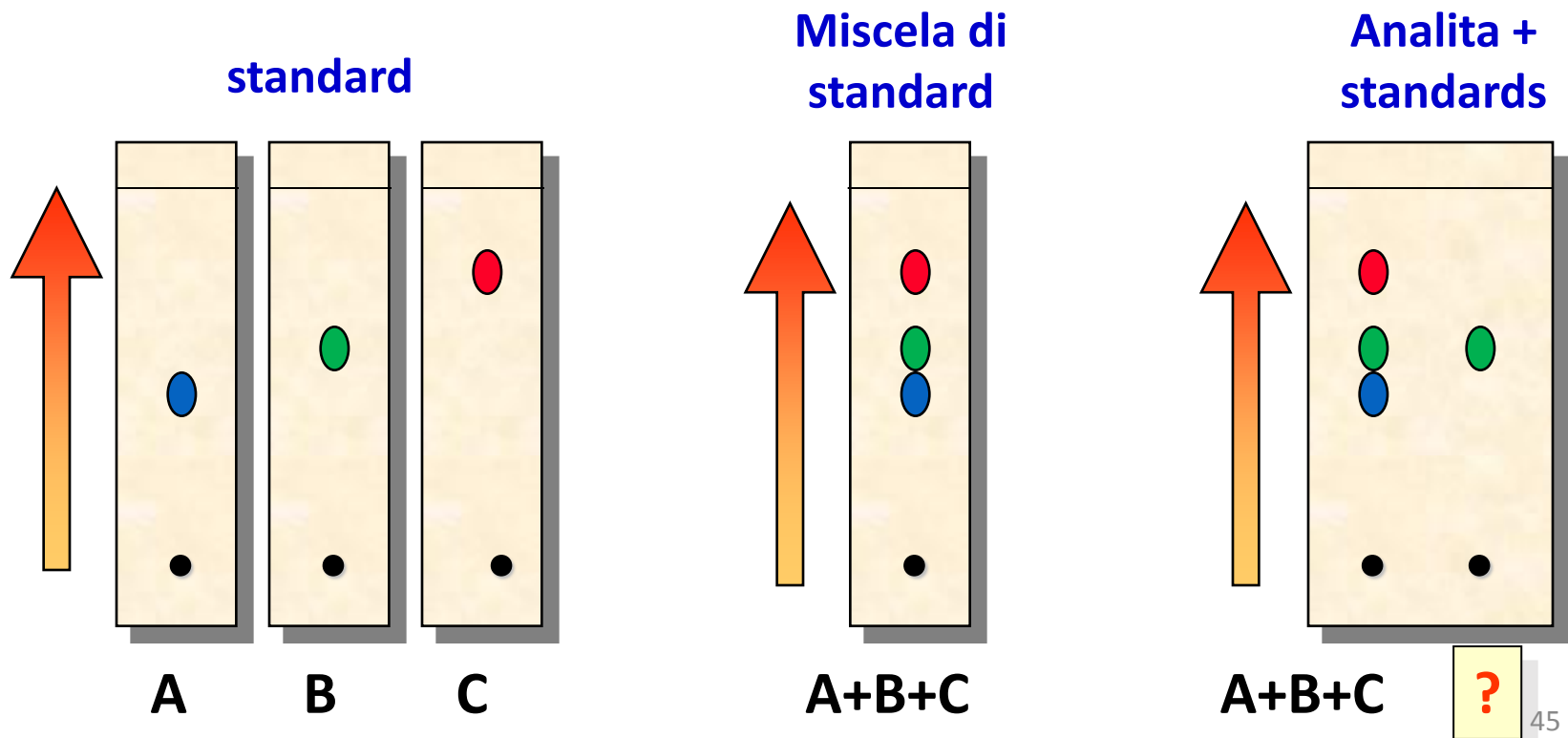
In pratica si usano particelle uniformi, sferiche e rigide, solitamente costituite da derivati del destrano (Sephacryl S), dell'agarosio (Sepharose 4B e 6B, Bio-Gel A), gel di poliacrilammide (Bio-Gel P) e cellulosa.

# BASI DEL PROCEDIMENTO CROMATOGRAFICO

- il campione è introdotto nella fase mobile, che può essere un gas, un liquido o un fluido supercritico
- la fase mobile viene fatta eluire in continuo attraverso la fase stazionaria, che deve essere immiscibile nell'eluente
- la fase stazionaria (liquida o solida) si trova all'interno di una *colonna* oppure è supportata su una *superficie piana*
- la fase mobile e la fase stazionaria sono scelte in modo che i componenti della miscela da separare si distribuiscano tra le due fasi
  - i componenti più affini alla fase stazionaria passeranno più tempo in questa fase, quindi si sposteranno più lentamente attraverso il sistema
  - i componenti più affini alla fase mobile si sposteranno invece più velocemente
- la separazione dei componenti avviene in quanto ogni sostanza ha una distribuzione caratteristica tra le due fasi (costante di ripartizione  $K_d = C_s / C_m$ )

# Cromatografia planare su strato sottile (TLC)

Una soluzione di una miscela viene applicata come un punto / banda sul fondo della piastra e lasciata viaggiare con il solvente sulla piastra.



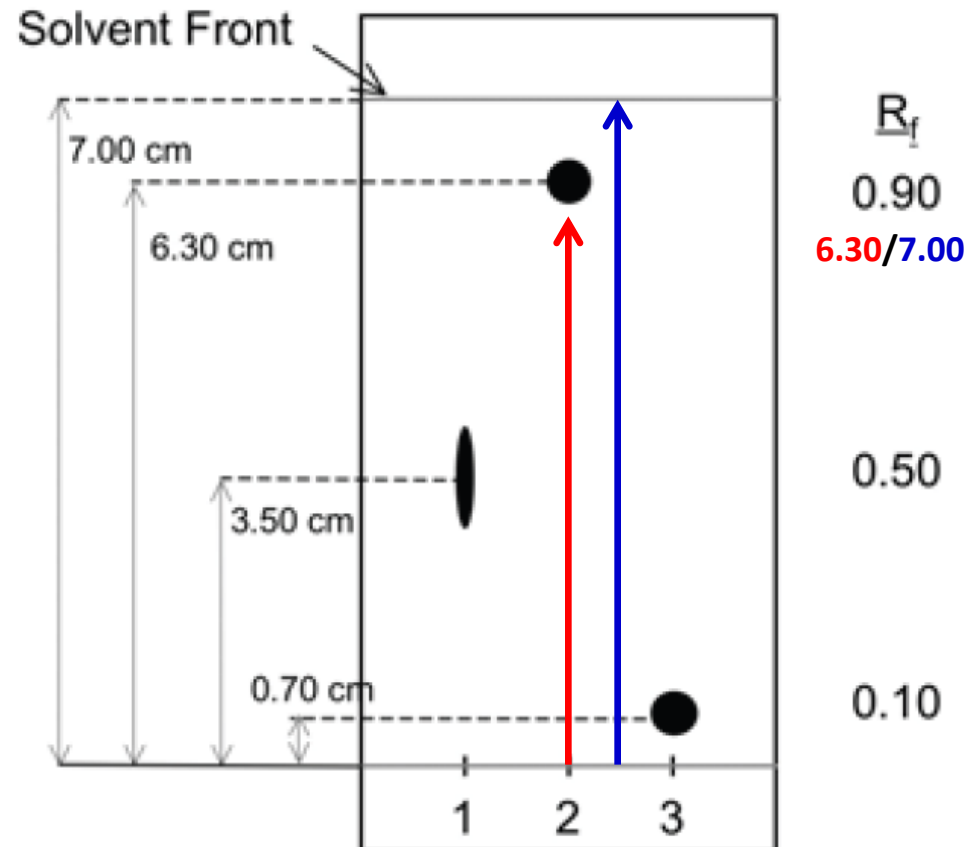
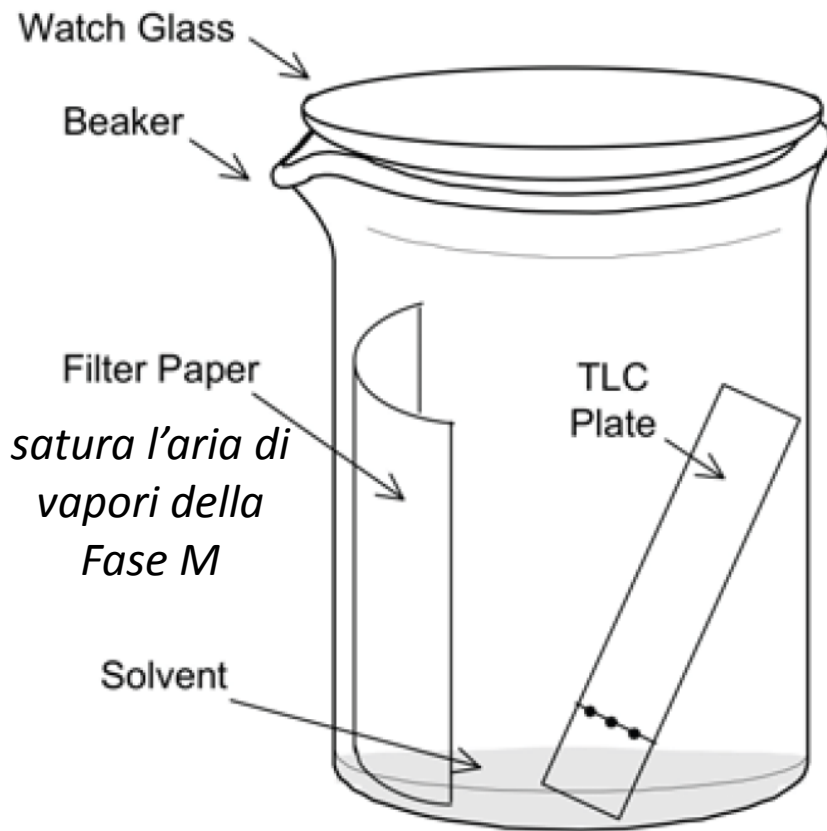
# Cromatografia su strato sottile (TLC)

Scelta della Fase M: accoppiare la polarità del solvente a quella dell'analita da separare.

Analiti idrosolubili: strati di cellulosa o di gel di silice ed un solvente relativamente polare

Analiti meno polari: strati di gel di silice attivato o di allumina e un solvente non acquoso, relativamente apolare.

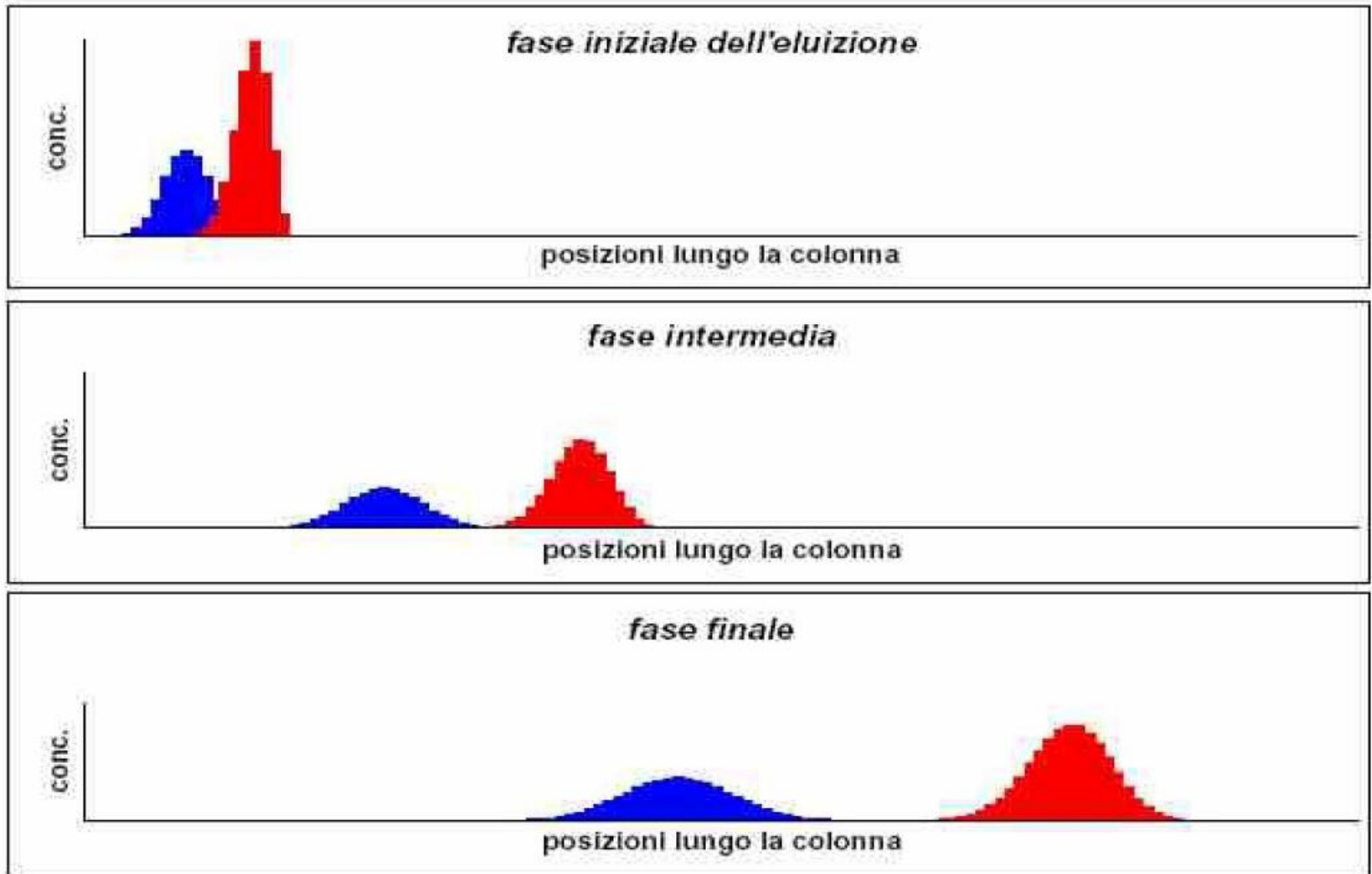
**La risoluzione è misurata da  $R_f$ . L'eluizione dipende dalla struttura della molecola**



# CROMATOGRAFIA SU COLONNA

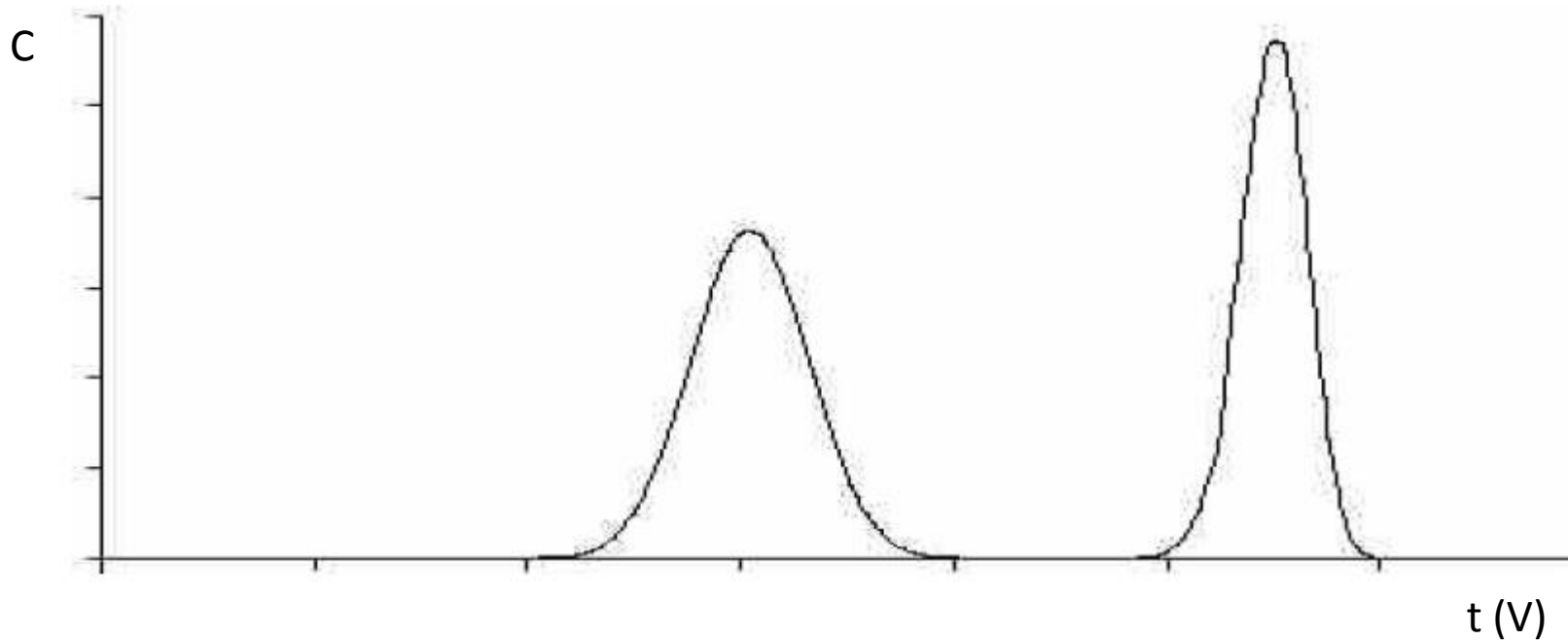
ESPERIMENTO FONDAMENTALE: illustra il principio su cui si basa la cromatografia

- Colonna riempita uniformemente di un materiale solido in granuli di dimensioni omogenee (Fase S).
- All'inizio della colonna si deposita la miscela contenente gli analiti.
- Si fa scorrere poi un solvente (Fase M, detta eluente): la Fase M trascinerà in modo diverso le diverse sostanze lungo la colonna, a seconda della loro affinità verso le due fasi.
- Tale effetto può essere ricostruito, anche numericamente, immaginando che nei vari strati della colonna si effettui una serie di estrazioni successive in cui si raggiunge l'equilibrio corrispondente al coefficiente di distribuzione.
- Effettuando infatti una simulazione numerica di tale successione di "micro-equilibri" si ottengono facilmente grafici che mostrano il procedere della separazione, con la distribuzione di ogni sostanza secondo i picchi di concentrazione (di forma 'gaussiana') tipica dei cromatogrammi



Con il procedere della separazione, le sostanze usciranno dalla colonna dopo il passaggio di un certo tempo (***tempo di ritenzione***) durante il quale è fluito un certo volume di solvente (***volume di ritenzione***).

# CROMATOGRAMMA



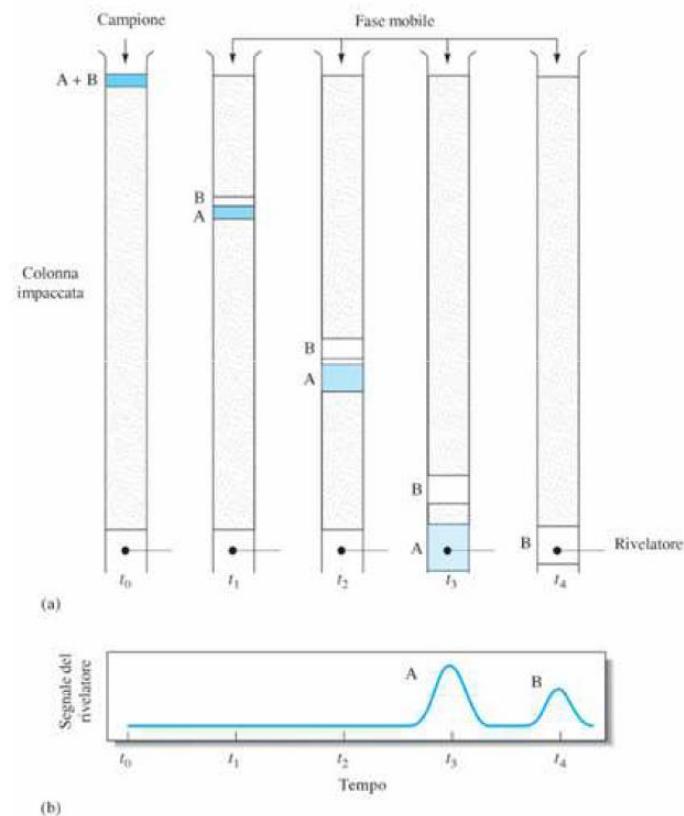
Se si misura la concentrazione delle sostanze in uscita dalla colonna si ottiene il cosiddetto ***cromatogramma*** (che riporta le **concentrazioni** di sostanza in uscita in funzione del **tempo** o del **volume** di eluente)

# VISUALIZZAZIONE DELLA SEPARAZIONE

Ponendo all'uscita della colonna un rivelatore che misuri la concentrazione del soluto nell'eluato (cioè la fase mobile che esce dalla colonna) e riportando il segnale in funzione del tempo si può ottenere un cromatogramma.

La posizione dei picchi sull'asse dei tempi, o tempo di ritenzione, serve per identificare i componenti del campione.

L'area sottesa dai picchi è proporzionale alla quantità di ogni singolo componente e può essere utilizzata a scopo quantitativo.

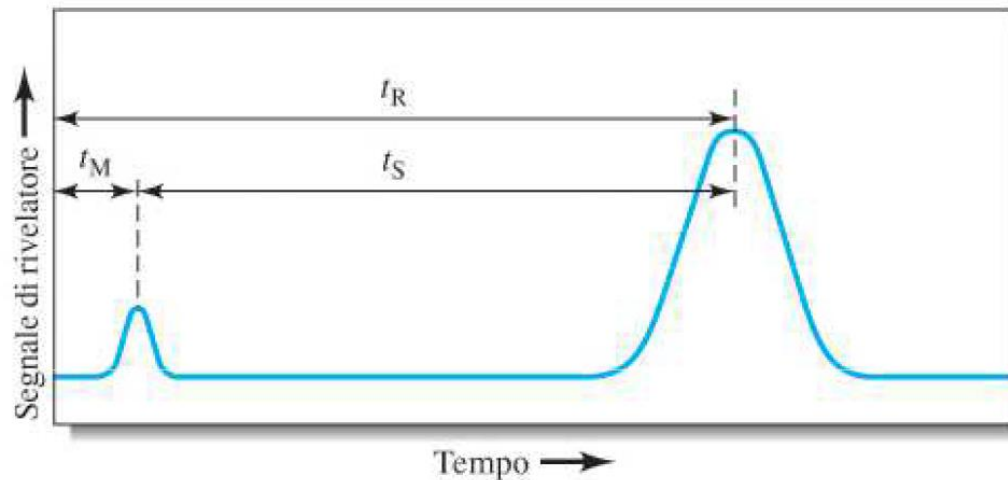




# TEMPO DI RITENZIONE

Il tempo di ritenzione  $t_R$  è il tempo che impiega un componente della miscela iniettata ad uscire dalla colonna o, tecnicamente, ad essere rivelato come picco dal detector. Un tipico cromatogramma per una miscela a due componenti ha due situazioni diverse:

- il picco a sinistra rappresenta un soluto che non ha alcuna interazione con la fase stazionaria ed esce al cosiddetto tempo morto,  $t_M$  ( $V_0$ )
- il picco a destra rappresenta un soluto che ha, invece, interazione con la fase stazionaria ed esce al tempo  $t_R > t_M$



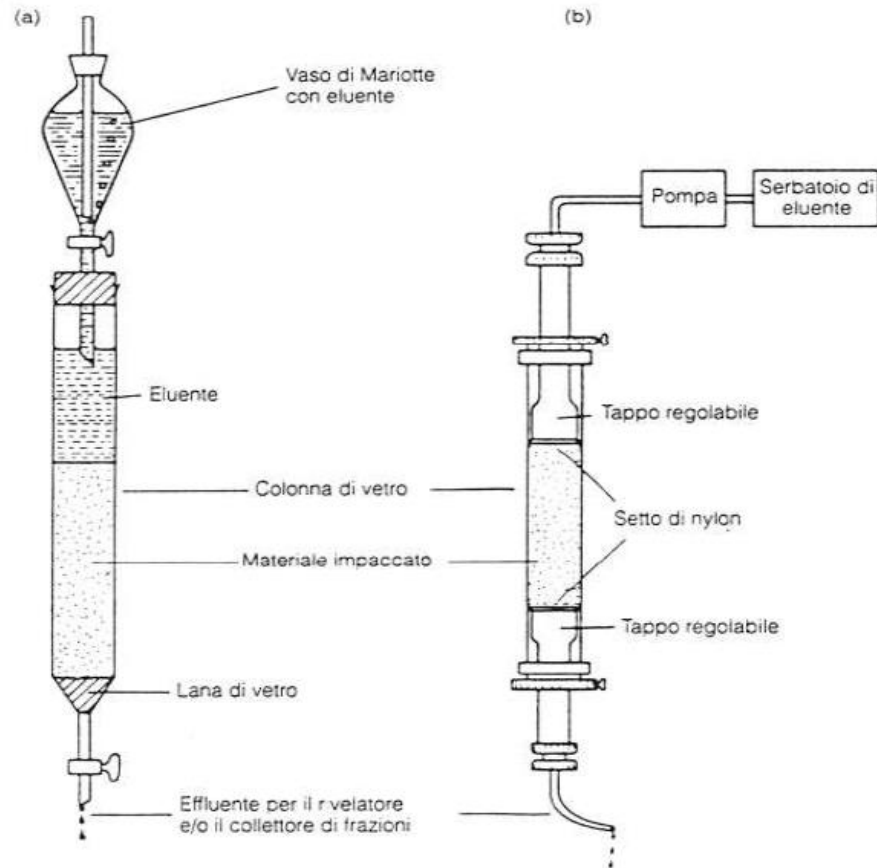
# CROMATOGRAFIA LIQUIDA SU COLONNA



I primi esperimenti di cromatografia su colonna utilizzavano colonne di vetro di 1-5 cm di diametro e lunghezza fino a 5 metri. Ciò richiedeva tempi di separazione molto lunghi.

Attualmente è possibile usare colonne di pochi cm di lunghezza, in grado di separare in pochi minuti molte sostanze. Queste colonne sono costituite da particelle di 1-5  $\mu\text{m}$  di diametro, che richiedono pressioni molto alte per forzare il passaggio della fase mobile attraverso la colonna. Per sistemi di questo genere il termine utilizzato è cromatografia liquida ad elevate prestazioni o elevate pressioni (HPLC, High Performance o High Pressure Liquid Chromatography)

# APPARATO PER CROMATOGRAFIA SU COLONNA

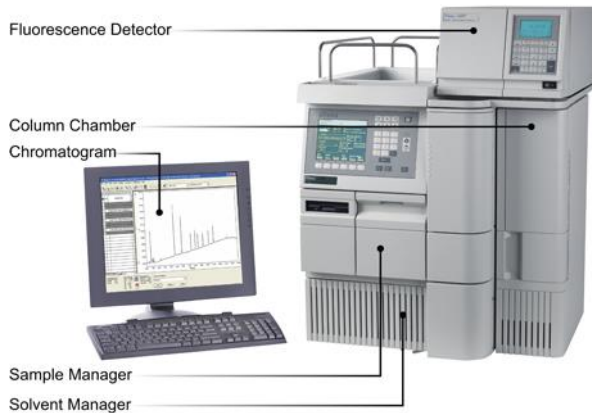


A valle della colonna:  
rivelatore,  
registratore,  
collettore di frazioni

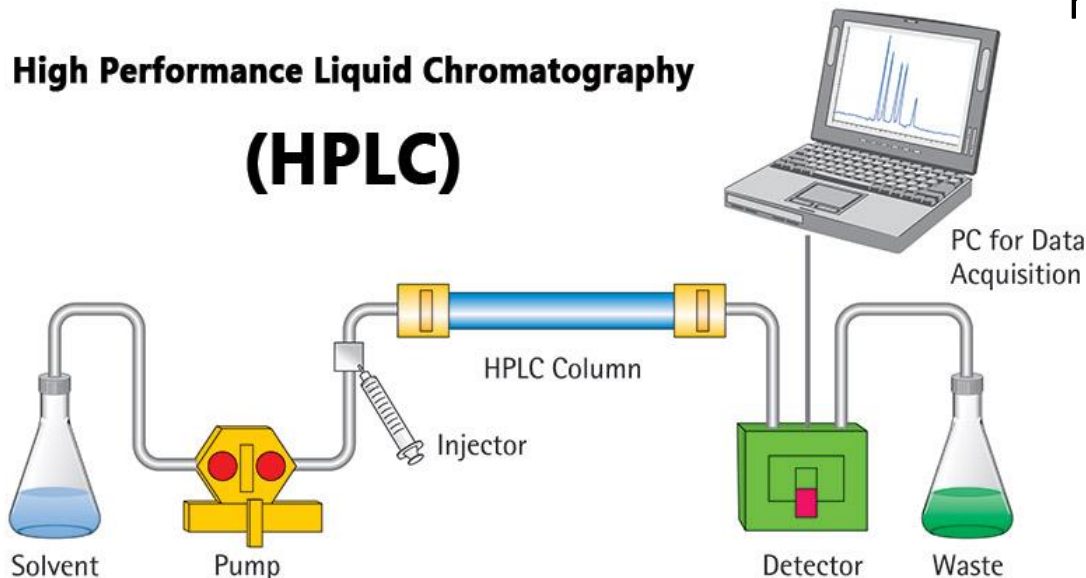
# STRUMENTAZIONE PER HPLC

Un cromatografo HPLC è costituito dalle seguenti parti:

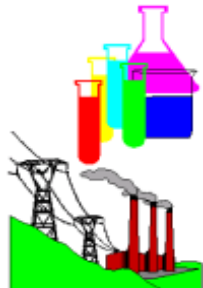
- bottiglia di solventi : uno o più solventi che possono essere utilizzati singolarmente o in miscela
- pompa con pressione fino a 400 Atm, flusso stabile tra 0.1 e 10 mL/min
- sistema di iniezione costituito da una valvola a più vie e da un circuito a volume fisso, o loop, nel quale si mette il campione
  - colonna cromatografica ed eventuale pre-colonna
  - rivelatore per monitorare gli eluati
- PC per gestire il sistema e i dati



## High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

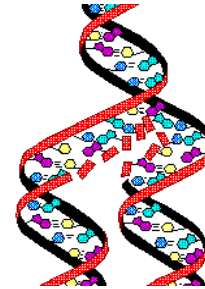


# HPLC applications



## Chemical

polystyrenes  
dyes  
phthalates



## Bioscience

proteins  
peptides  
nucleotides



## Pharmaceuticals

tetracyclines  
corticosteroids  
antidepressants  
barbiturates



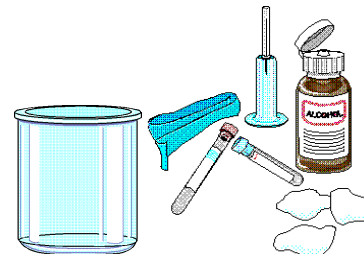
## Consumer Products

lipids  
antioxidants  
sugars



## Environmental

polyaromatic hydrocarbons  
Inorganic ions  
herbicides



## Clinical

amino acids  
vitamins  
homocysteine





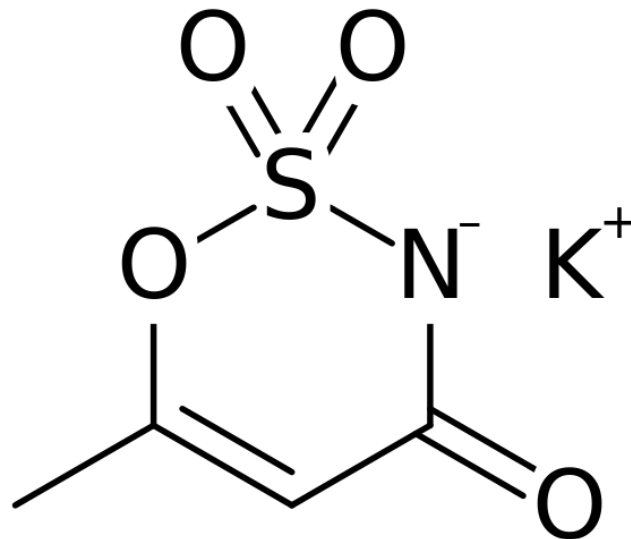
## ESEMPIO DI ANALISI HPLC

# How much pee is in our swimming pools? New urine test reveals the truth

Olympic swimmers admit to it and it seems many of the rest us are peeing in the water too, with a new scientific test finding up to 75 litres of urine in public pools



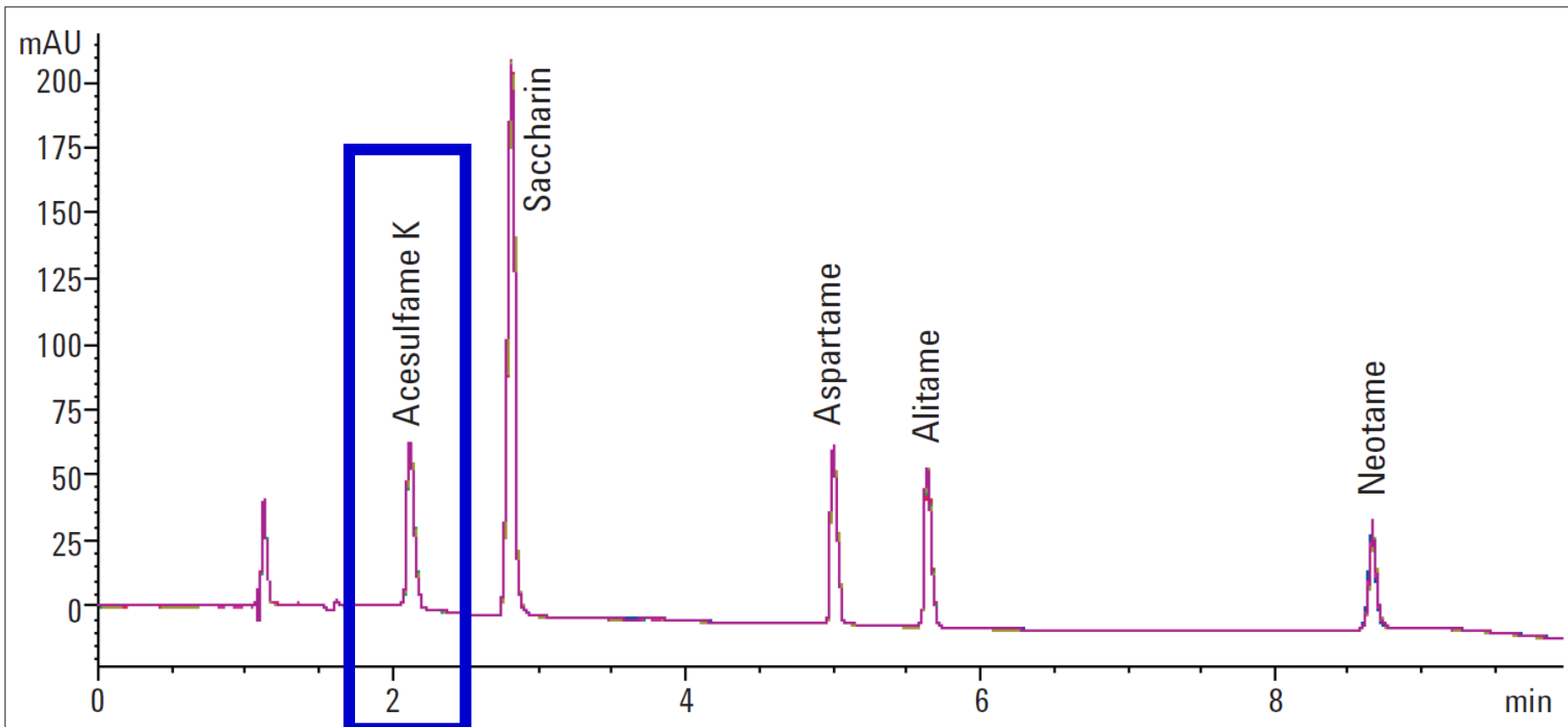
Il test funziona misurando la concentrazione di un dolcificante artificiale, l'acesulfame di potassio (ACE), che si trova comunemente negli alimenti confezionati e passa attraverso il corpo inalterato.



Dopo aver monitorato i livelli del dolcificante in due piscine pubbliche in Canada per un periodo di tre settimane, hanno calcolato che i nuotatori avevano rilasciato 75 litri di urina - sufficienti per riempire un bidone della spazzatura di medie dimensioni - in una grande piscina (circa 830.000 litri, un terzo delle dimensioni di una piscina olimpionica) e 30 litri in una seconda piscina, circa la metà delle dimensioni della prima.

Concentrazione più elevata nelle vasche idromassaggio

# RP-HPLC-UV analysis



**Column:** Agilent ZORBAX SB-C18, 4.6 × 150 mm, 5 μm

**Mobile phases:**

**A:** Potassium phosphate dibasic (10 mM); pH 6.30

**B:** Acetonitrile

**Flow rate:** 1.2 mL/min

**Column temperature:** 30 °C

**Detection:** 210 nm

**Gradient**

Time (min)	% Acetonitrile
0.0	8
9.0	50
10.0	50
10.1	8
Stop time:	10 min
Post time:	5 min