

# METODI CROMATOGRAFICI

Dal greco *chroma* : colore, *graphein* : scrivere  
1903 Mikhail Tswett (pigmenti vegetali su colonna di carbonato di calcio)

metodi chimico-fisici di separazione di miscele  
**numerossime applicazioni in campo alimentare, biologico,  
ambientale, farmacologico e clinico**

Utilizzando un sistema di rivelazione:

Può essere fatta l'analisi qualitativa (individuando le sostanze)

Oppure l'analisi quantitativa (valutando la concentrazione sulla base di una retta di calibrazione)

**diversa affinità** di ogni sostanza per due fasi

**NON MISCIBILI tra loro**

Tutti i sistemi cromatografici consistono in:

**FASE STAZIONARIA** immobilizzata

**FASE MOBILE** liquida (LC) o gassosa (GC)



Le molecole da separare devono avere  
**COEFFICIENTI di DISTRIBUZIONE** o di **partizione DIVERSI** nelle  
due fasi

# Quali principi chimico-fisici sono alla base della separazione?

**Si instaurano interazioni eterogenee:**

Legami a idrogeno

Interazioni dipolo-dipolo

Interazioni dipolo-dipolo indotto

Legami di Van der Waals

Formazione di composti di coordinazione

Meccanismi di scambio ionico

Interazioni steriche

**Ruolo fondamentale è giocato molto spesso dalla **POLARITA'****

## **Le TECNICHE CROMATOGRAFICHE possono essere classificate:**

### **In base alla forma del letto cromatografico**

**Cromatografia planare** (su carta, la fase stazionaria aderisce sulle fibre di cellulosa, **su strato sottile (TLC)** la fase stazionaria ricopre piastre di vetro, plastica e metallo)

**Cromatografia su colonna** (impaccata, open-tubular)

### **In base allo stato fisico della fase mobile**

Cromatografia Liquida (LC)

Gascromatografia (GC)

Cromatografia fluida supercritica (SFC)

### **In base al meccanismo di separazione**

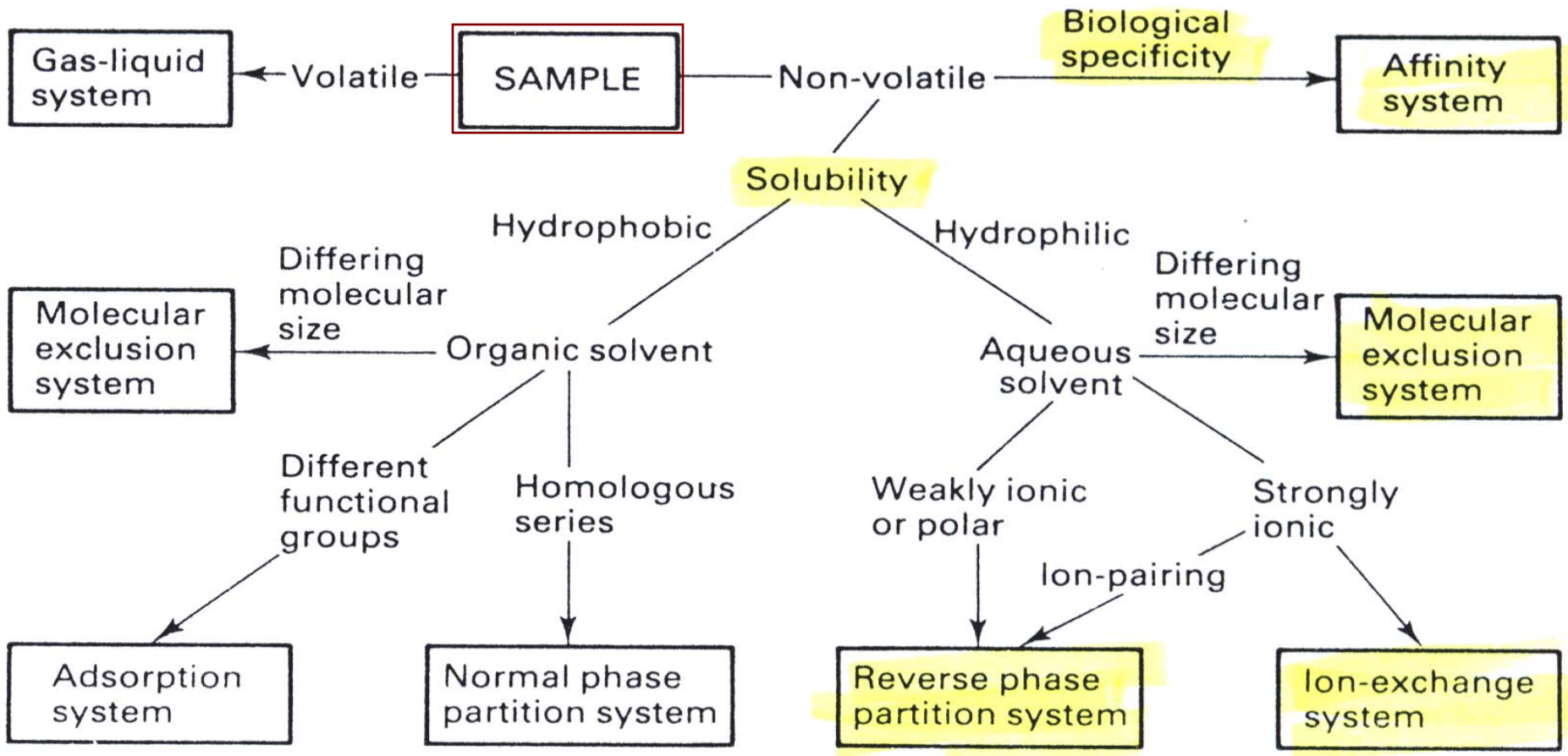
Adsorbimento

Ripartizione

Scambio ionico

Esclusione

Affinità



## **Cromatografia su carta e cromatografia su strato sottile (TLC)**

- riveste un ruolo di primo piano nel campo dell'analisi qualitativa organica per l'identificazione dei composti
- è una tecnica utilissima nel campo della ricerca, nella separazione di isomeri difficilmente separabili
- È una tecnica utile per seguire l'andamento di una reazione chimica di sintesi
- E' possibile utilizzarla sia come analisi qualitativa (paragonando con opportuni std) sia quantitativa (valutando l'intensità delle macchie)

# 1) CROMATOGRAFIA PLANARE: su carta o su strato sottile (TLC)

La **fase stazionaria** in TLC:

solidi attivi (adsorbimento), liquidi attivi supportati su particelle solide inerti (ripartizione), cellulose modificate scambiatrici di ioni (scambio ionico) **stratificati a spessori sottili su superfici piane** (lastrine di vetro, fogli di alluminio, fibre di vetro, fogli o lastre di resine) che ne costituiscono il supporto meccanico

**...solida (adsorbimento)**

**Gel di silice**

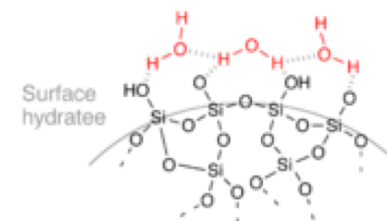
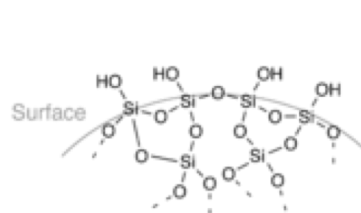
**Allumina (neutra, basica e acida)  $Al_2O_3$**

**Kieselguhr** : polvere di diatomee

**poliammidi** (polveri): tipo nylon 66

**silicato di magnesio** (florisil)

**fosfato di calcio, solfato di calcio** ecc.



**...liquida (ripartizione)**

**acqua**

**liquidi lipofili** supportati su cellulosa, kieselguhr: paraffine > C<sub>12</sub>, oli minerali, oli al silicone

## **Fase mobile**

in genere **solventi organici** a diversa polarità

` n-esano, eptano, cicloesano,  $\text{CCl}_4$ , benzene,  $\text{CHCl}_3$ , etere dietilico, acetato di etile, piridina, acetone, metanolo, acqua.

Tali solventi possono essere usati **puri o in miscela** tra loro, a diverse proporzioni

## **Camere di sviluppo:**

Permettono la separazione a sviluppo

Ascendente

Orizzontale

## **Rivelazione**

fasi stazionarie addizionate di indicatori di fluorescenza sensibili alle radiazioni UV comprese in un certo intervallo di lunghezze d'onda, vengono irradiate con lampade che emettono in una banda intorno a 254 nm e 366 nm.

**rivelazione chimica: universale o specifica**



Con le comuni fasi stazionarie solide gli idrocarburi non sono affatto adsorbiti e sono i primi ad essere eluiti, l'affinità per tali tipi di fasi stazionarie decresce nel seguente ordine:

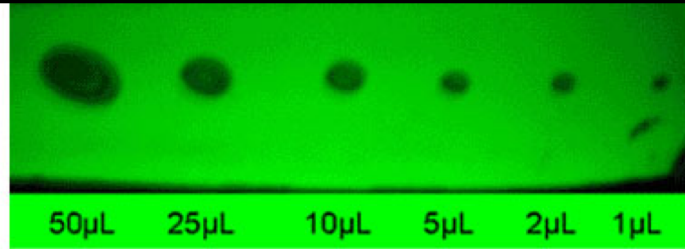
acidi, alcoli, ammine, tioli, aldeidi, chetoni, esteri, eteri, alcheni, alcani;

## polarità

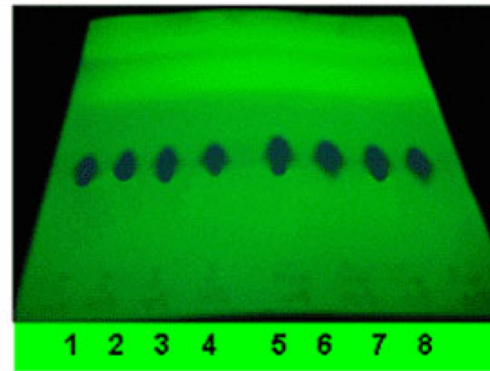
serie eluotropa su *gel di silice*.



Miscela o solventi puri	composizione
Benzene	
Benzene/cloroformio	1+1
Cloroformio	
Cicloesano/acetato d'etile	8+2
Cloroformio/acetone	95+5
Benzene/acetone	9+1
Benzene/acetato d'etile	8+2
Cloroformio/dietiletere	9+1
Benzene/metanolo	95+5
Benzene/dietiletere	6+4
Cicloesano/acetato di etile	1+1
Cloroformio/dietiletere	8+2
Benzene/acetone	8+2
Cloroformio/metanolo	99+1
Benzene/metanolo	9+1
Cloroformio/acetone	85+15
Benzene/dietiletere	4+6
Benzene/acetato di etile	1+1
Cloroformio/dietiletere	6+4
Cicloesano/acetato d'etile	2+8
Acetato di butile	
Cloroformio/metanolo	95+5
Cloroformio/acetone	7+3
Benzene/acetato di etile	3+7
Acetato di butile/metanolo	99+1



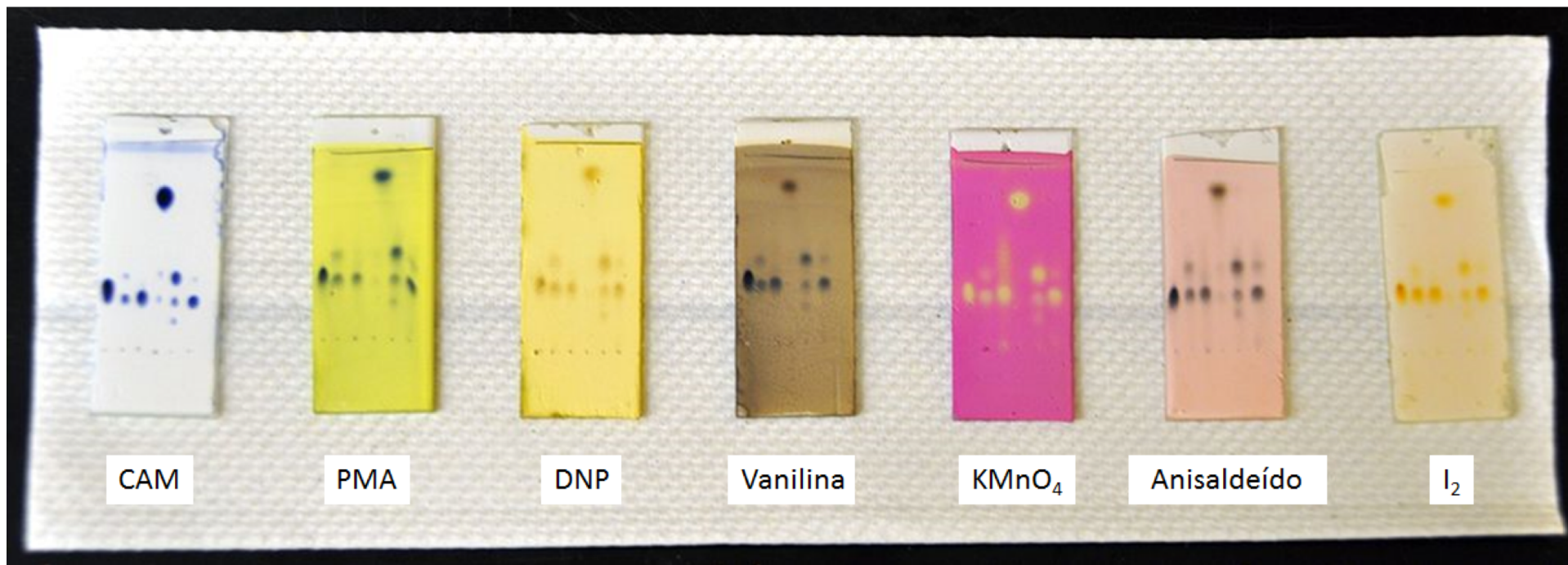
A



B

1) naproxeno en etanol al 100 %; 2) naproxeno en etanol al 97,5 %; 3) naproxeno en etanol al 95 %; 4) naproxeno en etanol al 90 %; 5) grasa dura más naproxeno en etanol al 100 %. 6) grasa dura más naproxeno en etanol al 97,5 %; 7) grasa dura más naproxeno en etanol al 95 %; 8) grasa dura más naproxeno en etanol al 90 %.

**Fig. 3.** Resultados de la determinación de sensibilidad del revelador (A) y de la capacidad del método para diferenciar la intensidad de las manchas de diferente concentración (B).



CAM: Cerio-ammonio molibdato, generico

PMA: acido fosfomolibdico, generico

DNP: 2,4 dinitrofenilidrazina, aldeidi e chetoni

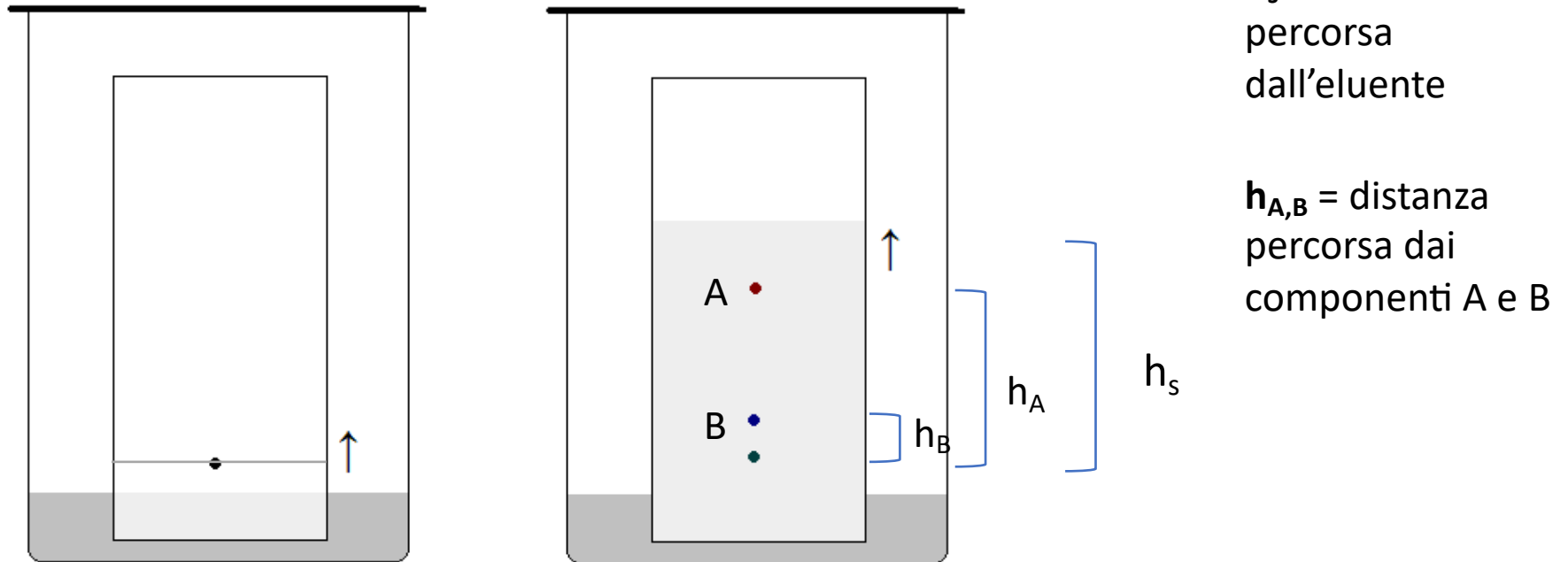
Vanilina: generico

KMnO<sub>4</sub>: Permanganato di potassio, olefine o gruppi ossidabili

Anisaldeide: generico, specialmente nucleofili

I<sub>2</sub>: iodio, composti organici aromatici e insaturi

# Cromatografia su carta e cromatografia su strato sottile



$h_s$  = distanza percorsa dall'eluente

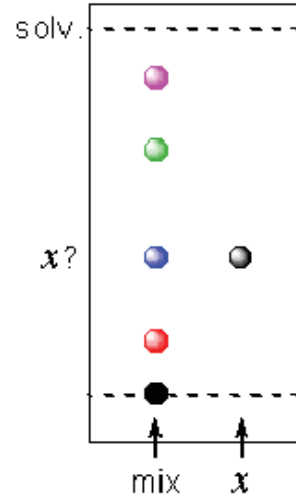
$h_{A,B}$  = distanza percorsa dai componenti A e B

$$R_f = \text{fattore di ritenzione} = h_{A,B} / h_s$$

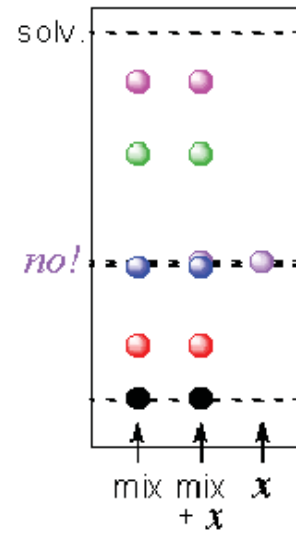
**Per un dato sistema cromatografico, il fattore di ritenzione di una sostanza è una costante caratteristica della stessa in condizioni sperimentali riproducibili!!!**



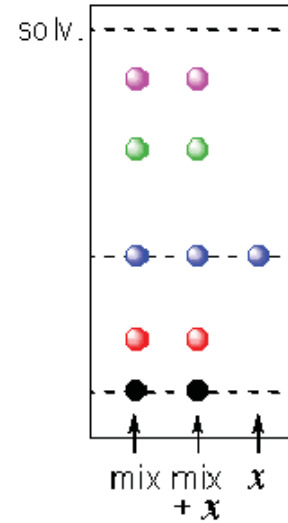
prima dello sviluppo



dopo lo sviluppo



dopo lo sviluppo



dopo lo sviluppo

*sì  
probabilmente la  
sostanza x è  
presente nella  
mix*

# Cromatografia su carta e cromatografia su strato sottile

I principali parametri con cui si valutano le prestazioni di una TLC sono:

- **selettività**

si valuta misurando i rispettivi fattori di ritenzione ( $R_f$ ) dei componenti; più sono diversi tra loro maggiore è la selettività

- **efficienza**

capacità delle macchie dei singoli componenti, di migrare compatte.

fattori che influenzano l'efficienza:

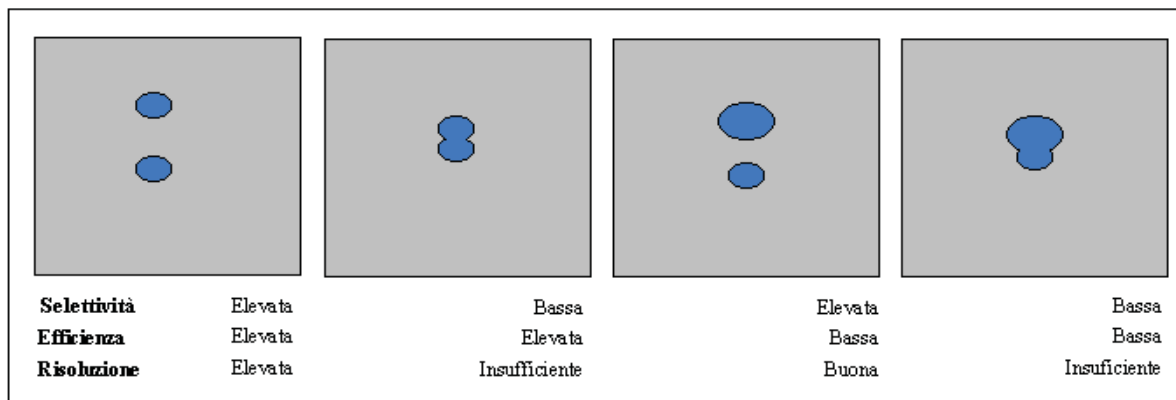
- diametro medio dei granuli

- omogeneità dei diametri dei granuli

- omogeneità nell'impaccamento dello strato

- **risoluzione**

attitudine del sistema a dare alla fine della corsa macchie ben distinte



# Applicazioni

- ✓ Per determinare il numero di componenti una miscela;
- ✓ Per determinare l'identità di sostanze;
- ✓ Per la messa appunto delle condizioni più adatte allo svolgimento di una cromatografia su colonna;
- ✓ Per controllare il progresso di una reazione chimica;
- ✓ Per determinare l'efficacia di una purificazione;
- ✓ Per monitorare l'andamento di una cromatografia su colonna;
- ✓ Per svolgere analisi microanalitiche.

## Vantaggi

- ✓ Semplicità di esecuzione
- ✓ Rapidità d'esecuzione
- ✓ Tecnica molto economica
- ✓ Richiede minime quantità di sostanza
- ✓ Tecnica sensibile
- ✓ Le lastre possono essere trattate con una varietà di sostanze chimiche che impartiscono alla fase stazionaria un'ampia gamma di proprietà

## Svantaggi

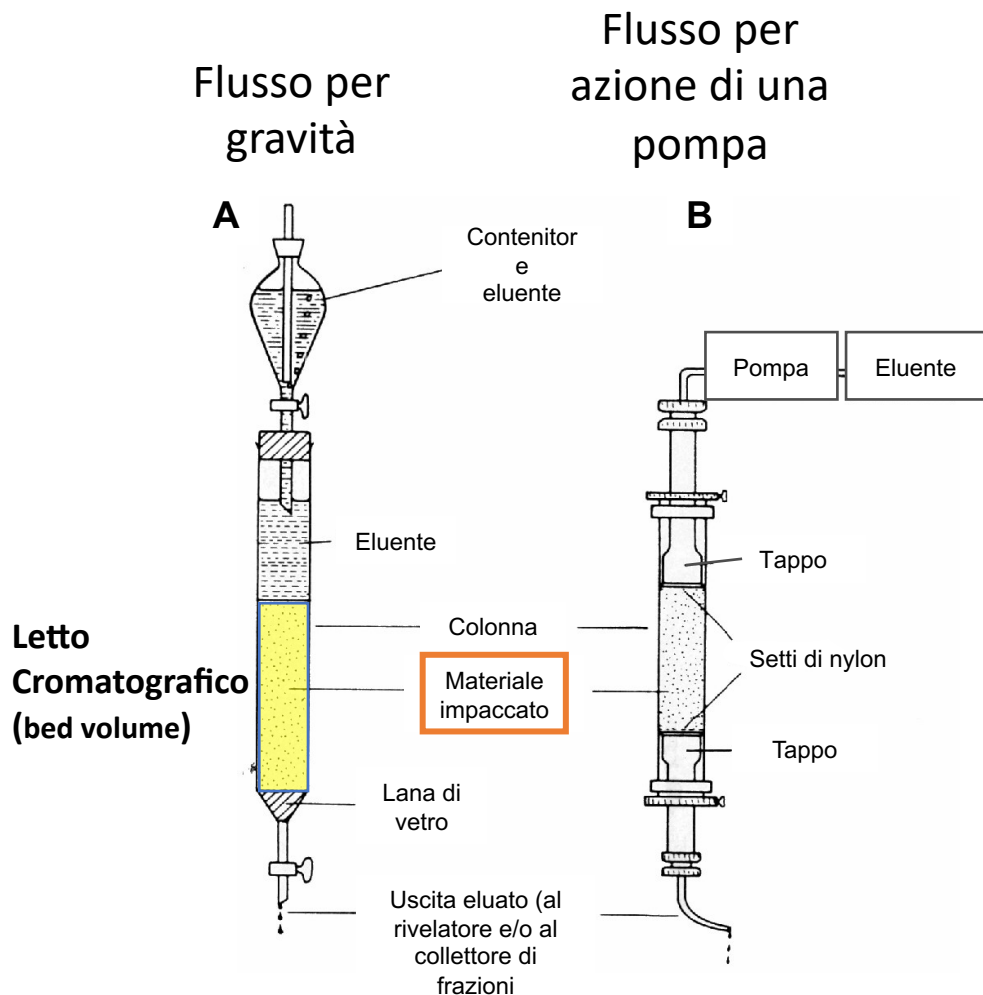
Numero di piatti teorici limitato

## 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..*)



# Tipologie di colonne cromatografiche per LC



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

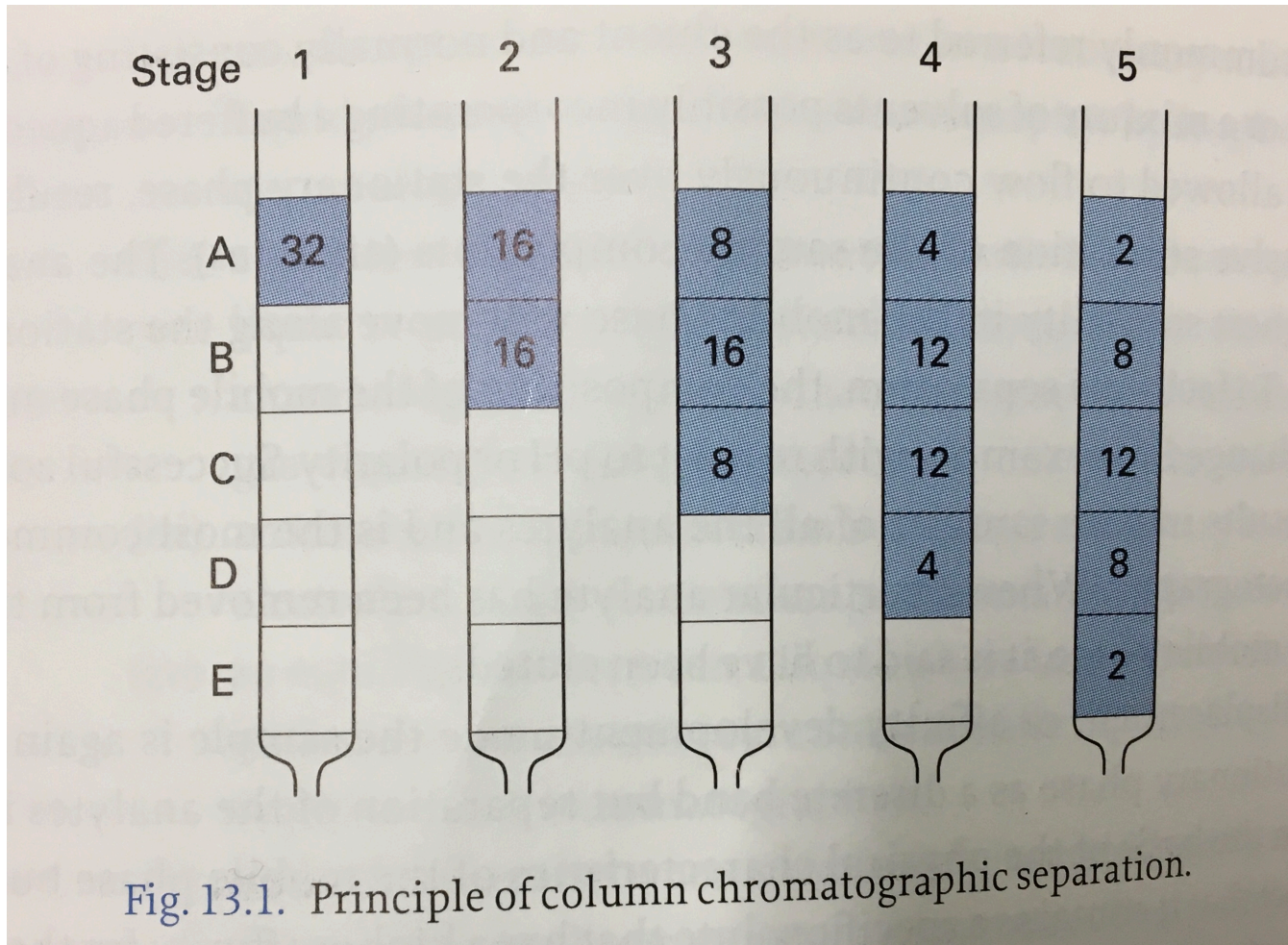
$$V_S = 10\text{cm}^3 \text{ e } V_M = 1\text{cm}^3$$

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

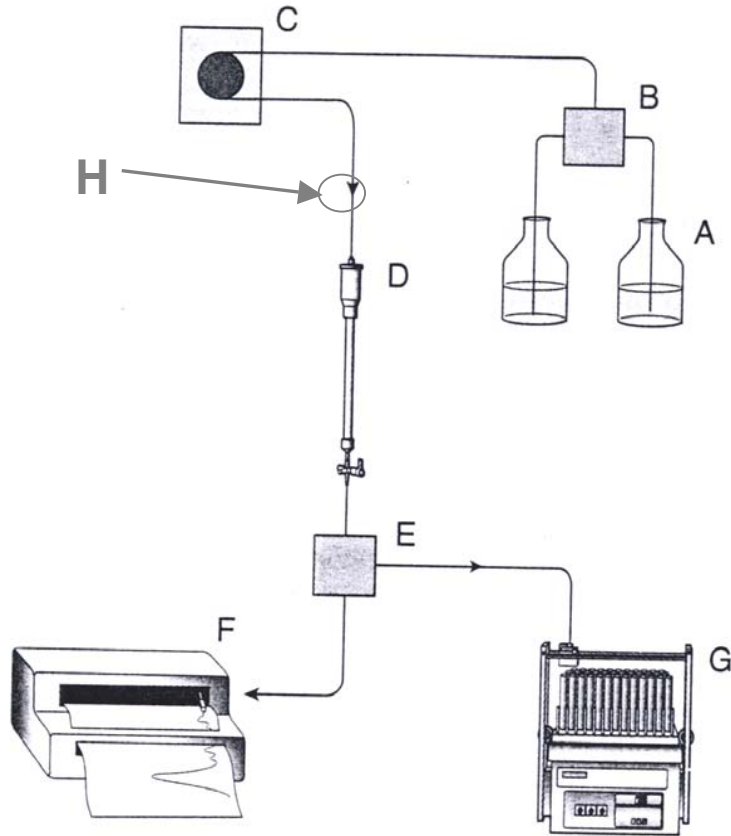
$$k'_D = \frac{[X]_S V_S}{[X]_M V_M} = K_D \frac{V_S}{V_M}$$

$$k'_D = 1 \frac{10}{1} = 10$$

# Principio di separazione cromatografica



# Schema del processo



**A:** tampone di eluizione

**B:** miscelatore o formatore di gradiente

**C:** sistema di pompaggio

**D:** colonna cromatografica

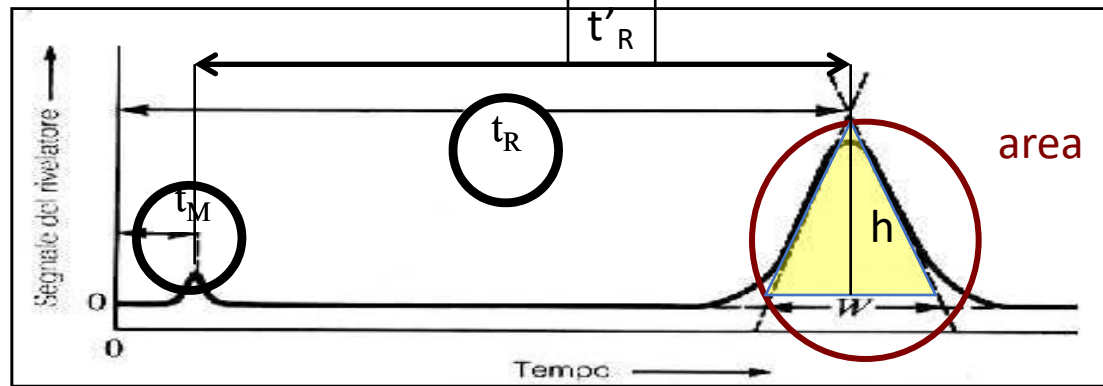
**E:** rivelatore

**F:** plotter per cromatogramma

**G:** raccogliatore di frazioni

**H:** rubinetto a tre vie o loop di iniezione

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 ( $V_R = t_R \cdot vel_{flusso}$ )**).

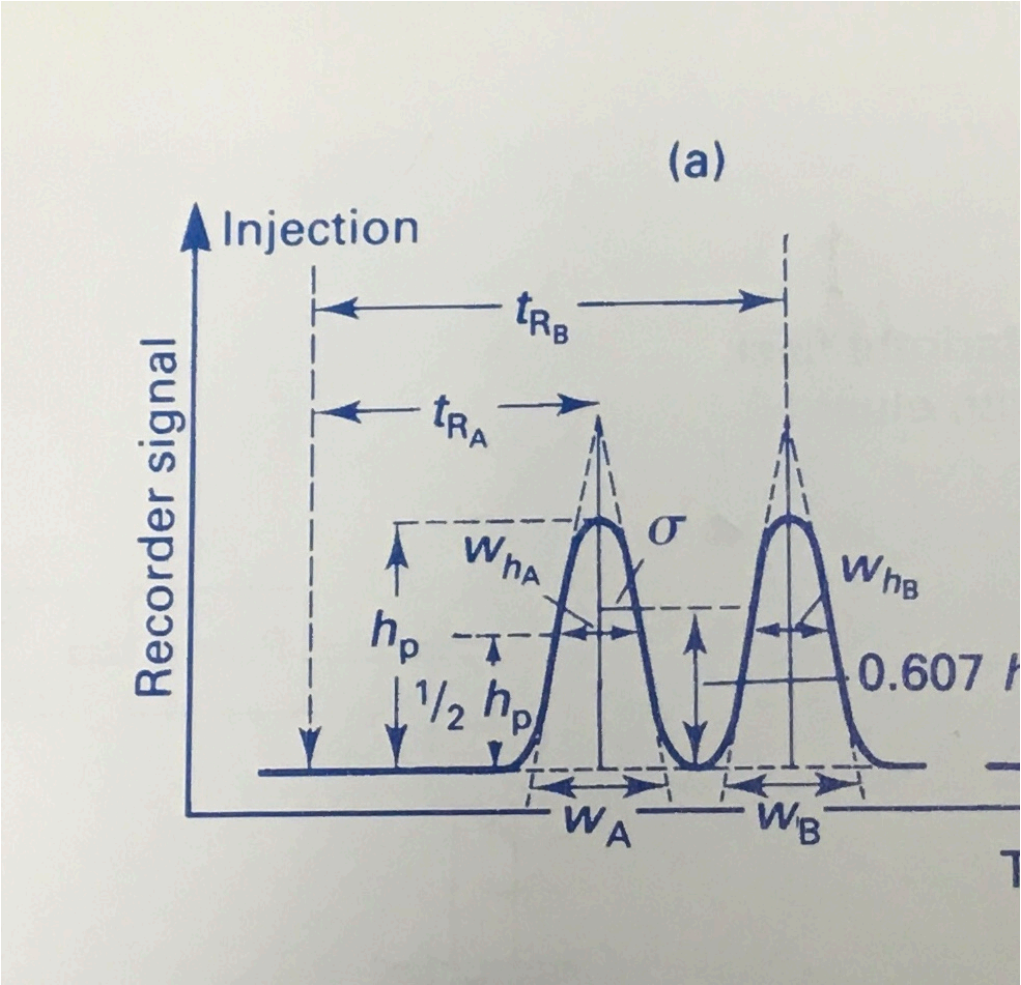
**Tempo di ritenzione corretto ( $t'_R$ ):** tempo speso da ogni sostanza eluita in virtù delle interazioni chimico-fisiche con la fase stazionaria ( $t_R - t_M$ )

**Larghezza della base ( $w_b$ ):** assumono di solito la forma di una gaussiana ( $= 4\sigma$ )

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

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

# Parametri relativi al cromatogramma





## Rapporto di ripartizione o rapporto di capacità, $k'$

**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  $k' = 0$ )

Rapporto volumetrico delle fasi

$$k' = \frac{t_R - t_M}{t_M} = \frac{t'_R}{t_M} = \frac{M_S}{M_M} = K_D \times \frac{V_S}{V_M}$$

**Può essere ricavato dai  
parametri del  
cromatogramma**

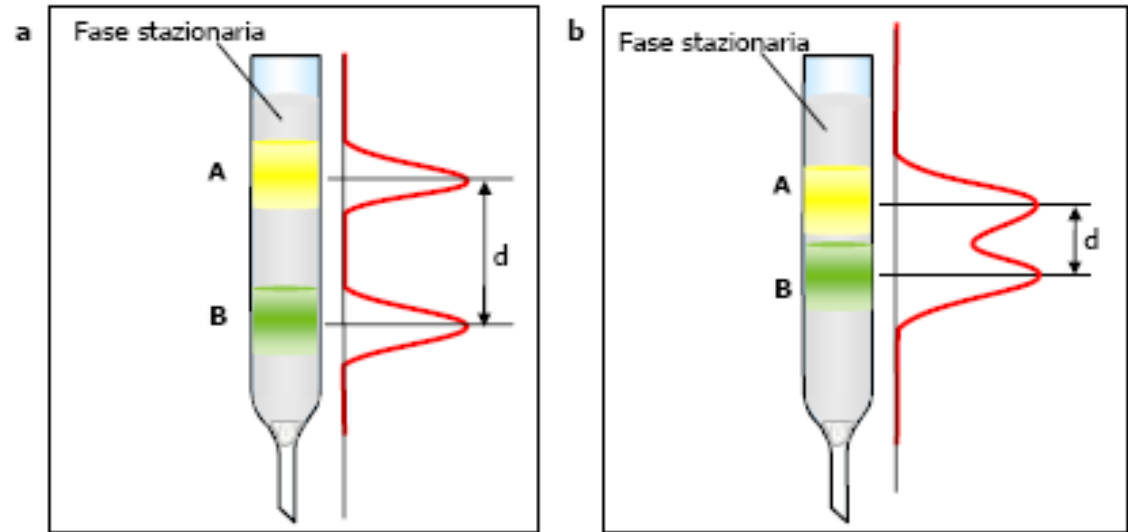
**$k'$  è tanto più elevato quanto più a lungo è trattenuto il soluto**  
 **$0 < k' < 10$**

# 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 ( $\alpha$ ):

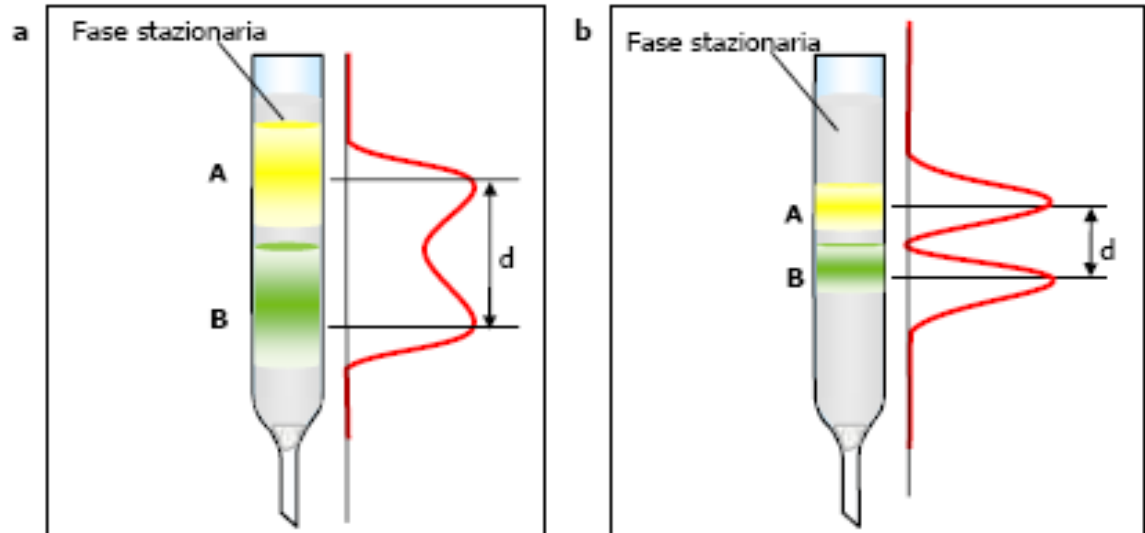
$$\alpha = \frac{t_{R1} - t_M}{t_{R2} - t_M} = \frac{t'_{R1}}{t'_{R2}} = \frac{k'_1}{k'_2}$$

Dipende dalle caratteristiche chimiche delle fasi stazionaria e mobile

# 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**



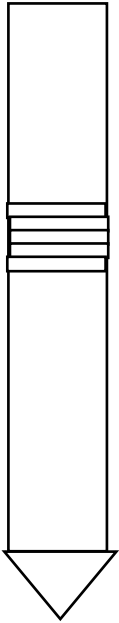
Poco efficiente

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 sui 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 gli equilibri a cui l'analita è sottoposto

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

$$H = L/N$$

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

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

**Eq. di Van Deemter**

$$\text{HETP: } A + B/u + C u$$

$u$  = 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).

# Parametri da considerare per valutare una separazione cromatografica:

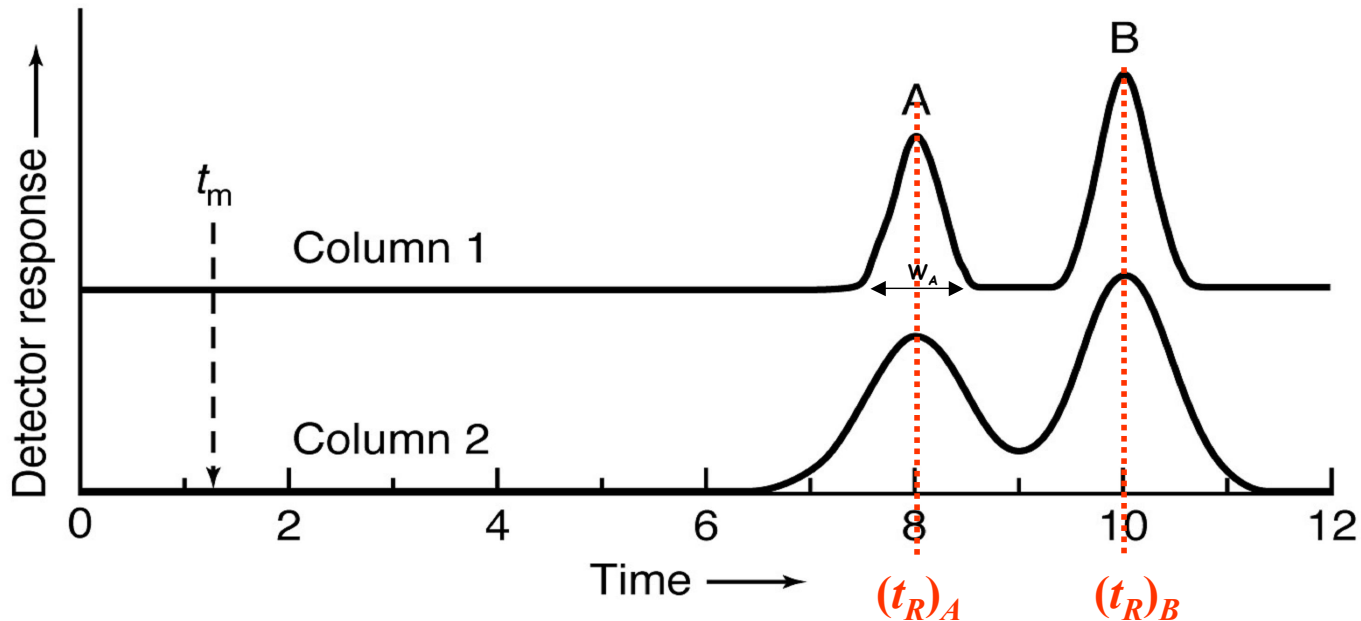
## RISOLUZIONE di una COLONNA (efficienza e selettività)

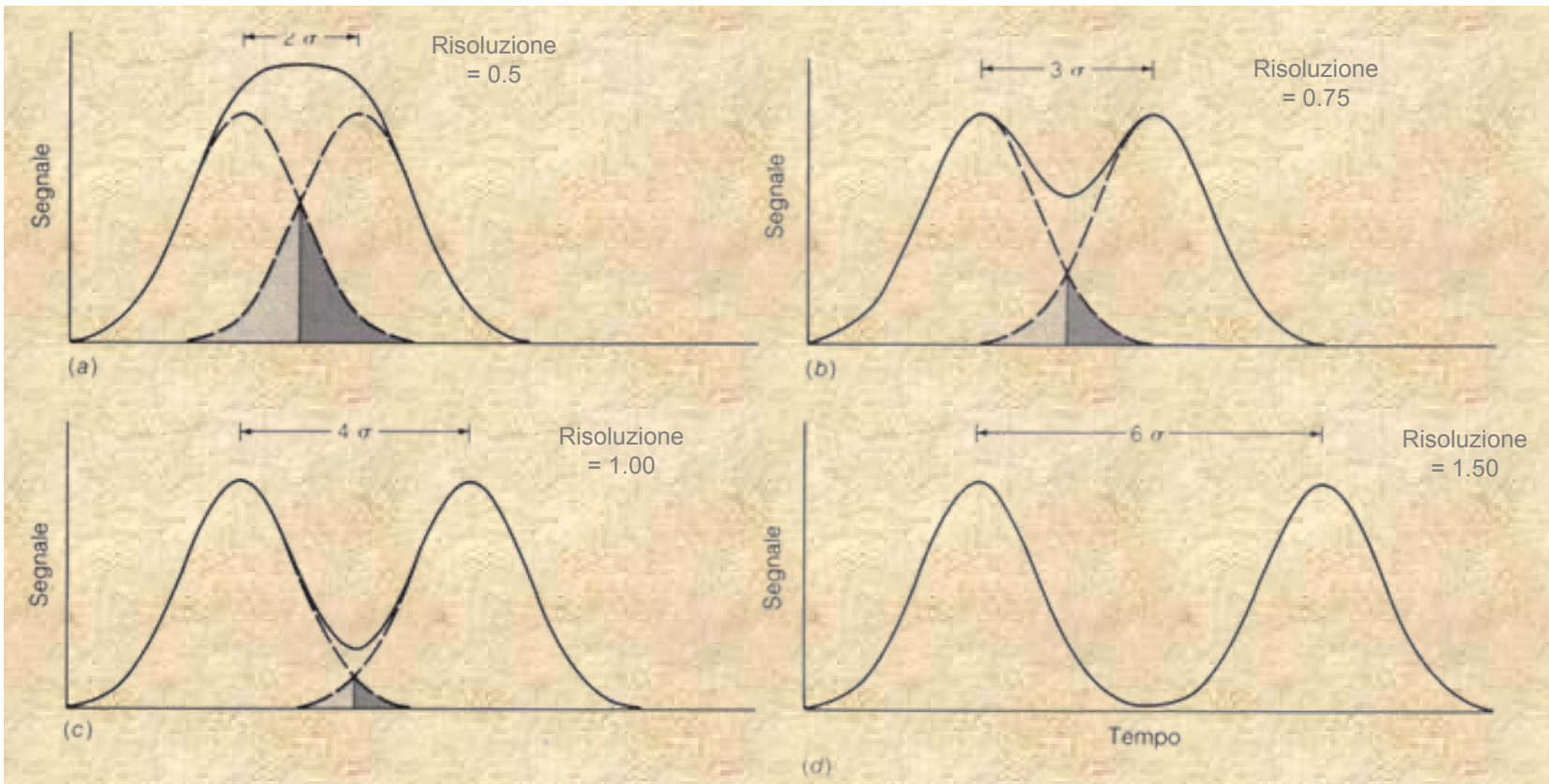
La risoluzione,  $R$ , è una misura quantitativa della capacità di separare due analiti.

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

$W = 4\sigma$

$R > 1,5$





**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



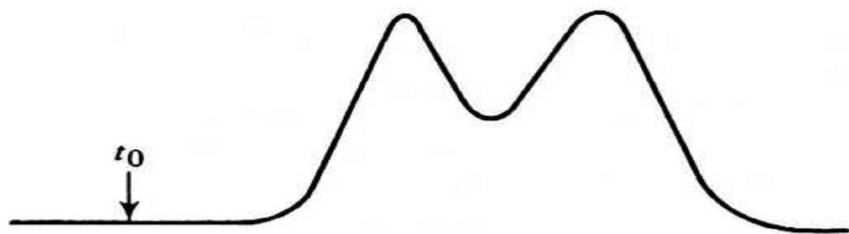
## **Variabili che influenzano la RISOLUZIONE (separazione dei picchi) di una colonna**

Scelta della fase stazionaria

Scelta della fase mobile

Lunghezza della colonna

Temperatura



A

**risoluzione scarsa**



B

**buona risoluzione dovuta a  
buona efficienza**

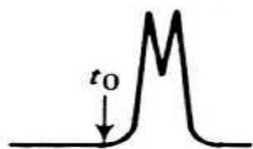
← **picchi stretti**



C

**buona risoluzione dovuta  
a buona selettività**

← **picchi distanti**



D

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

# Dettaglio matrici cromatografia

## Cellulosa:

È un polisaccaride lineare, formato da MONOMERI di GLUCOSIO con legame  $\beta$  1-4. [figura 1].

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

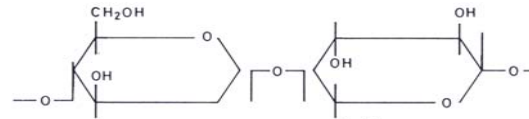


Fig.1: Cellulosa: Struttura chimica



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

## Agarosio:

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

È 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].

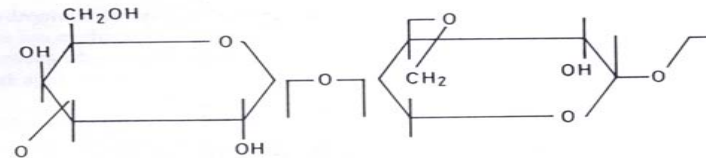


Fig.3: Agarosio: Struttura chimica

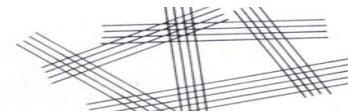


Fig.4: Struttura del gel

## Destrano

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

E' formato da catene di *GLUCOSIO* con legame  $\alpha$  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.

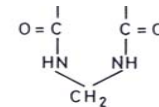
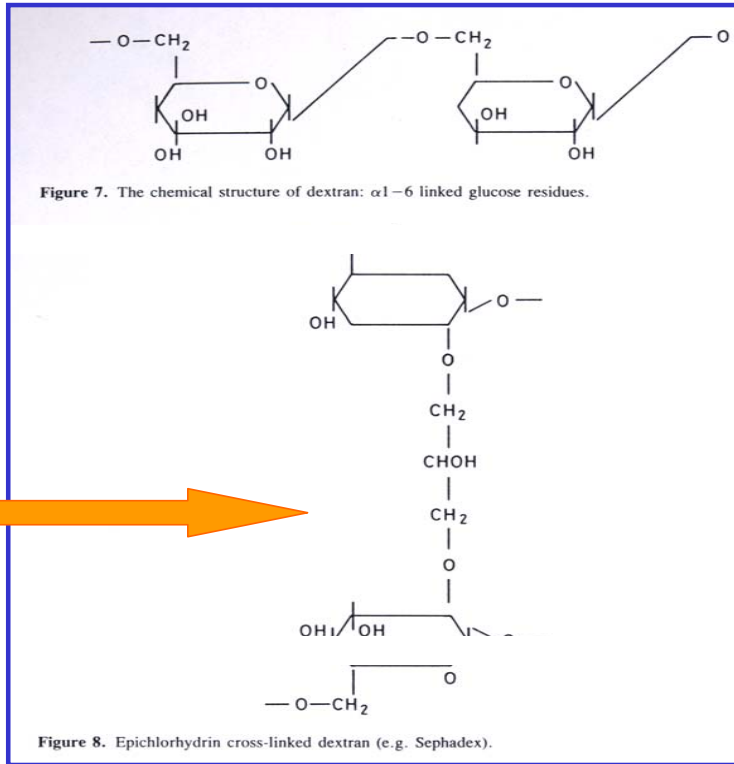


Figure 9. The repeating unit of polyacrylamide.

Unità ripetitiva  
della poliacrilamide

## Le resine posso 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

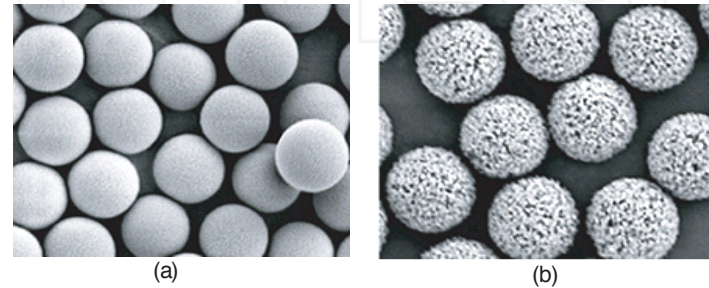


Figure 6. (a) Non-porous beads (b) Porous beads

## Relazione tra dimensione della particella, pressione e risoluzione

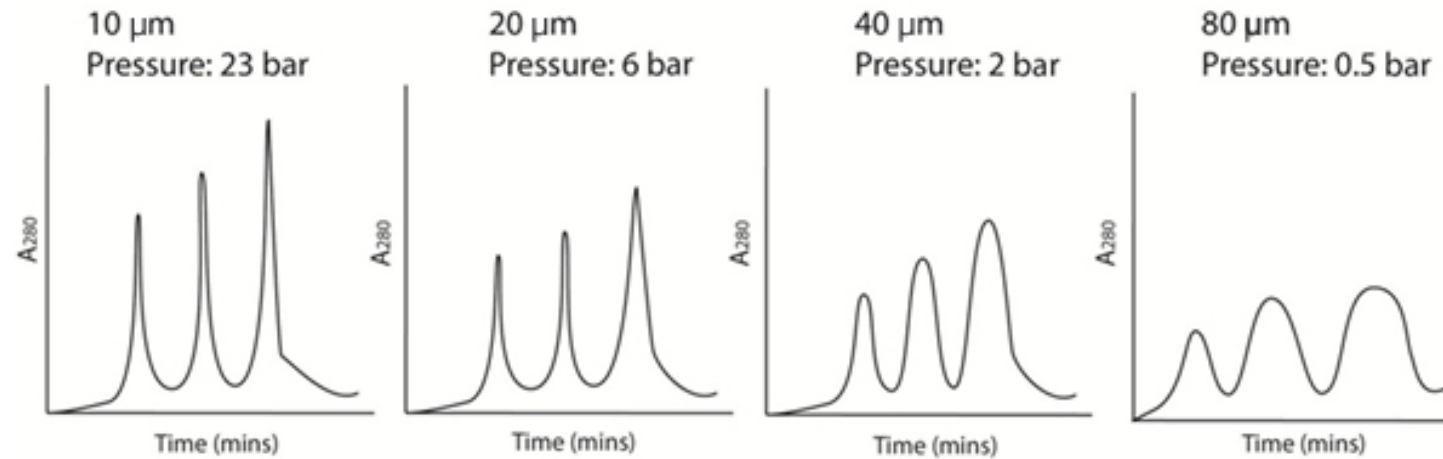


Fig. 6. Relationship between resin particle size, pressure, and resolution.

## **Le TECNICHE CROMATOGRAFICHE possono essere classificate:**

### **In base alla forma del letto cromatografico**

Cromatografia planare (**su carta**, la fase stazionaria aderisce sulle fibre di cellulosa, **su strato sottile (TLC)** la fase stazionaria ricopre piastre di vetro, plastica e metallo)

Cromatografia su colonna (impaccata, open-tubular)

### **In base allo stato fisico della fase mobile**

Cromatografia Liquida (LC)

Gascromatografia (GC)

Cromatografia fluida supercritica (SFC)

### **In base al meccanismo di separazione**

Adsorbimento

Ripartizione

Scambio ionico

Esclusione

Affinità

# 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.

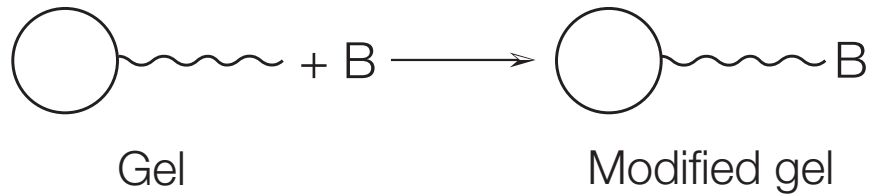
E' caratterizzata **da alta selettività, alta risoluzione e alta capacità** permettendo la purificazione e la concentrazione di proteine anche di 100 volte

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

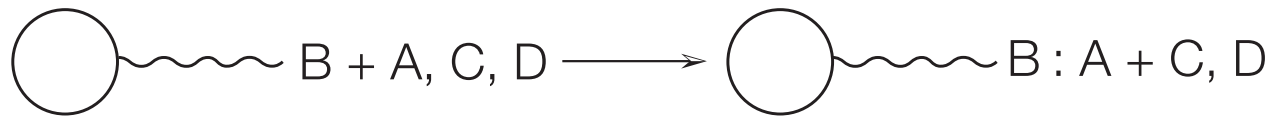
Le interazioni tra proteina e ligando sono di natura elettrostatica, interazioni idrofobiche, forze di van der Waals o ponti idrogeno.



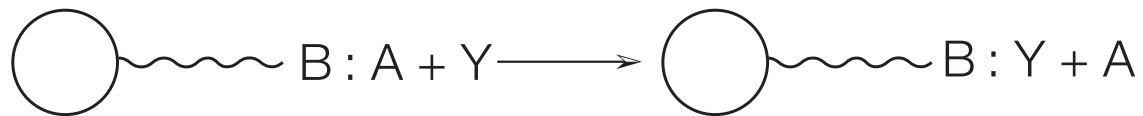
1. Attach ligand B to gel:



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 ⇔ substrate analogue, inhibitor, cofactor.
- Antibody ⇔ antigen, virus, cell.
- Lectin ⇔ polysaccharide, glycoprotein, cell surface receptor, cell.
- Nucleic acid ⇔ complementary base sequence, histones, nucleic acid polymerase, nucleic acid binding protein.
- Hormone, vitamin ⇔ receptor, carrier protein.
- Glutathione ⇔ glutathione-S-transferase or GST fusion proteins.
- Metal ions ⇔ Poly (His) fusion proteins, native proteins with histidine, cysteine and/or tryptophan residues on their surfaces.

La purificazione prevede 3 passaggi:

- incubazione del campione grezzo con la resina immobilizzata con il ligando
- Lavaggio dalla colonna delle molecole non legate (aspecifiche)
- Eluizione (distacco e recupero) della molecola di interesse dal ligando attraverso la modifica della fase mobile.

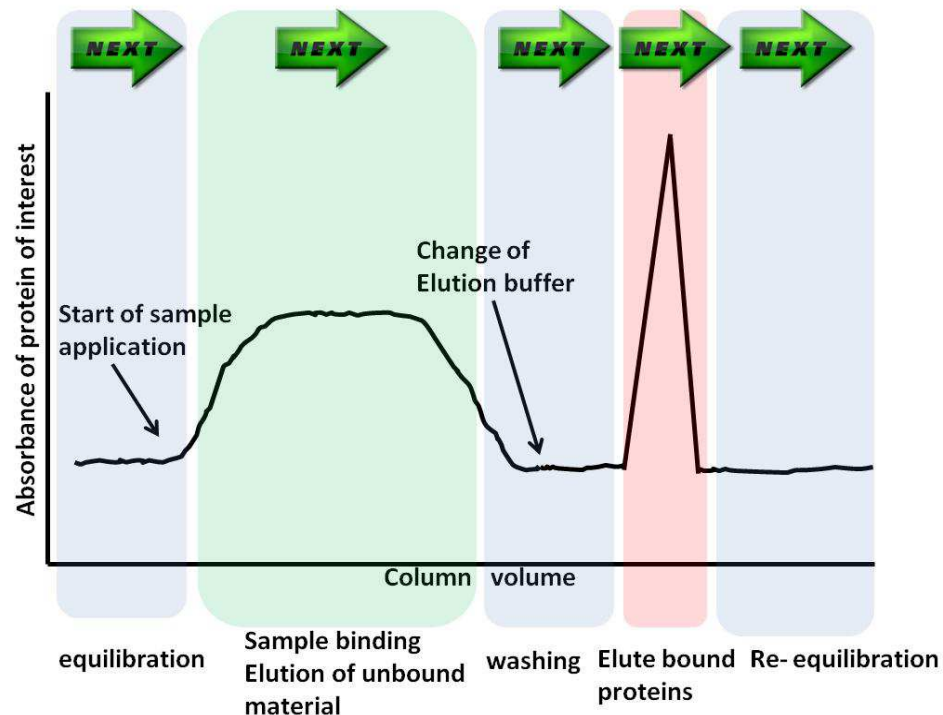


Fig. 1. Typical affinity chromatography purification

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

<b>Application</b>	<b>HiTrap and HiPrep columns</b>
<b>Isolation of human immunoglobulins</b>	
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 <sub>3</sub> strong affinity for monoclonal mouse IgG <sub>1</sub> 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
<b>Purification of fusion proteins</b>	
(His) <sub>6</sub> 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
<b>Other Group Specific Media</b>	
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 <sub>1</sub>	++++	++++
	IgG <sub>2</sub>	++++	++++
	IgG <sub>3</sub>	–	++++
	IgG <sub>4</sub>	++++	++++
	IgM*	variable	–
Avian egg yolk	IgY**	–	–
Cow		++	++++
Dog		++	+
Goat		–	++
Guinea pig	IgG <sub>1</sub>	++++	++
	IgG <sub>2</sub>	++++	++
Hamster		+	++
Horse		++	++++
Koala		–	+
Llama		–	+
Monkey (rhesus)		++++	++++
Mouse	IgG <sub>1</sub>	+	++++
	IgG <sub>2a</sub>	++++	++++
	IgG <sub>2b</sub>	+++	+++
	IgG <sub>3</sub>	++	+++
	IgM*	variable	–
Pig		+++	+++
Rabbit	no distinction	++++	+++
Rat	IgG <sub>1</sub>	–	+
	IgG <sub>2a</sub>	–	++++
	IgG <sub>2b</sub>	–	++
	IgG <sub>3</sub>	+	++
Sheep		+/-	++

\* Purify using HiTrap IgM Purification HP columns.

\*\* Purify using HiTrap IgY Purification HP columns.

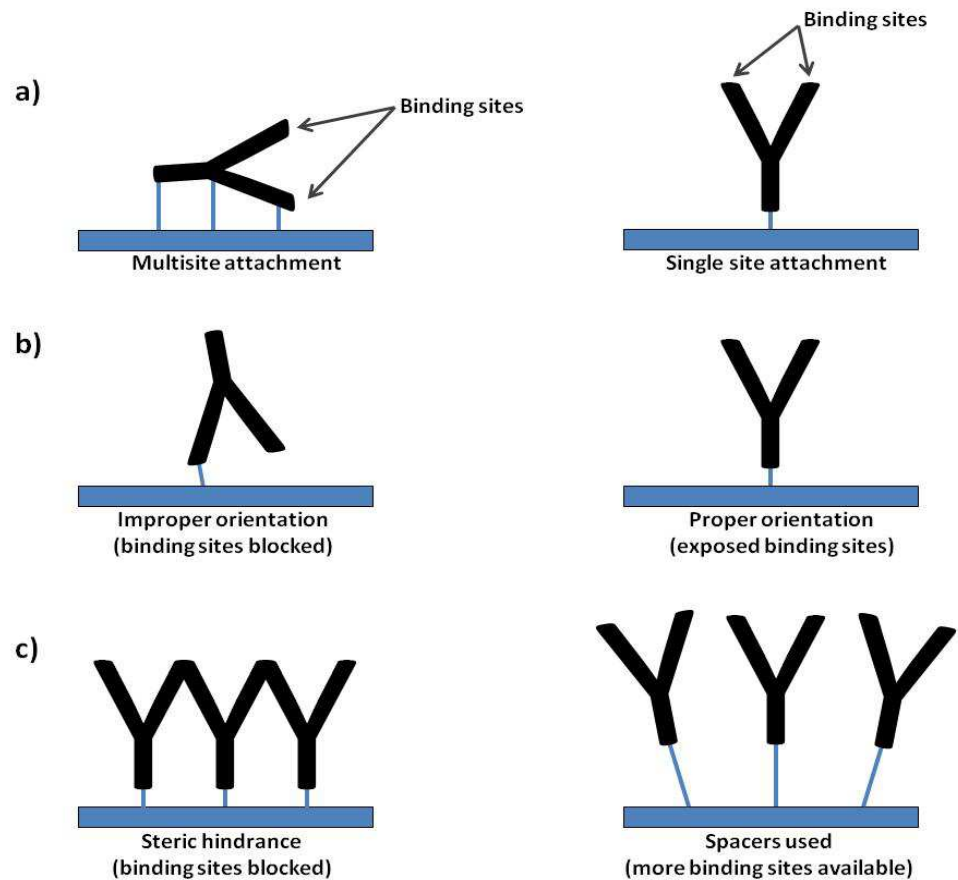
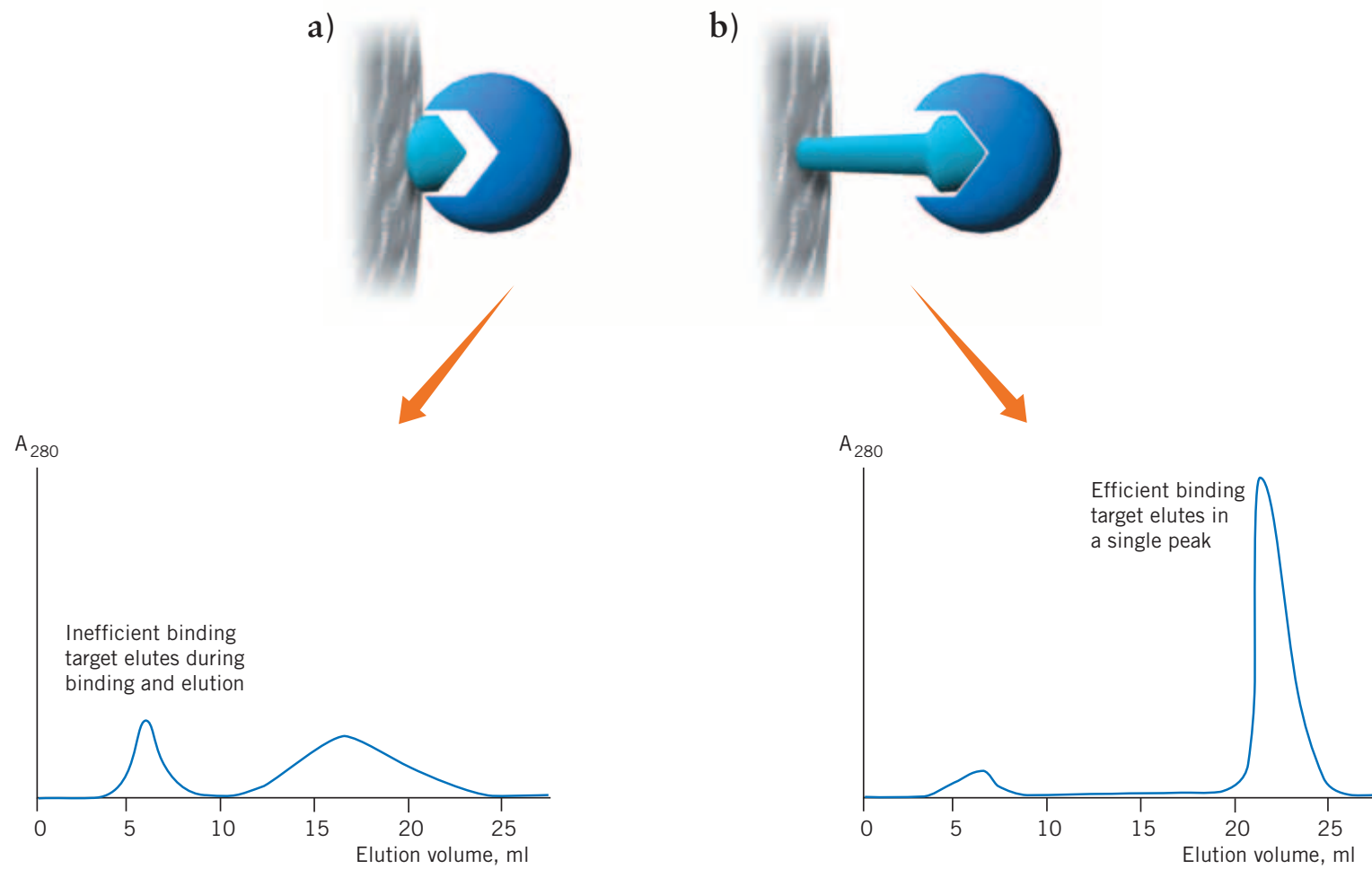
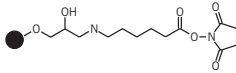
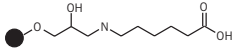
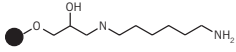
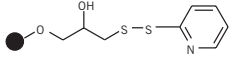
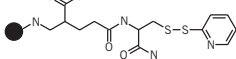
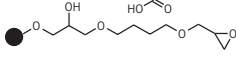
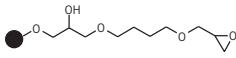
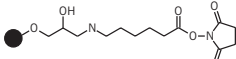
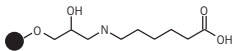
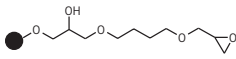
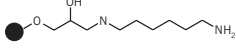
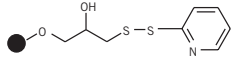


Fig. 8. Potential immobilization problems which can affect affinity ligand activity by a) multi-site attachment, (b) improper orientation, and (c) steric hindrance.



**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
<b>Proteins, peptides, amino acids</b>			
amino	10-atom		HiTrap NHS-activated HP NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow
	None	—	CNBr-activated Sepharose 4B CNBr-activated Sepharose 4 Fast Flow
carboxyl	10-atom		ECH Sepharose 4B
	11-atom		EAH Sepharose 4B
thiol	4-atom		Thiopropyl Sepharose 6B
	10-atom		Activated Thiol Sepharose 4B
	12-atom		Epoxy-activated Sepharose 6B
<b>Sugars</b>			
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
<b>Polynucleotides</b>			
amino	None		CNBr-activated Sepharose 4B CNBr-activated Sepharose 4 Fast Flow
mercurated base	4-atom		Thiopropyl Sepharose 6B
<b>Coenzymes, cofactors, antibiotics, steroids</b>			
amino, carboxyl, thiol or hydroxyl			use matrix with spacer arm (see above)



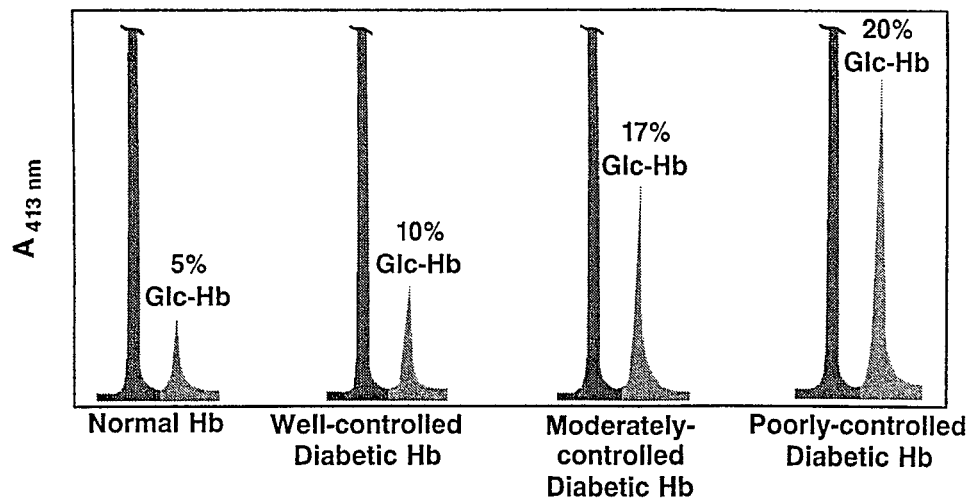


Fig. 2. Determination of glycohemoglobin (*Glc-Hb*) by HPAC for 10- $\mu$ L samples of diluted whole blood.

Adapted with permission from Singhal and DeSilva (14).

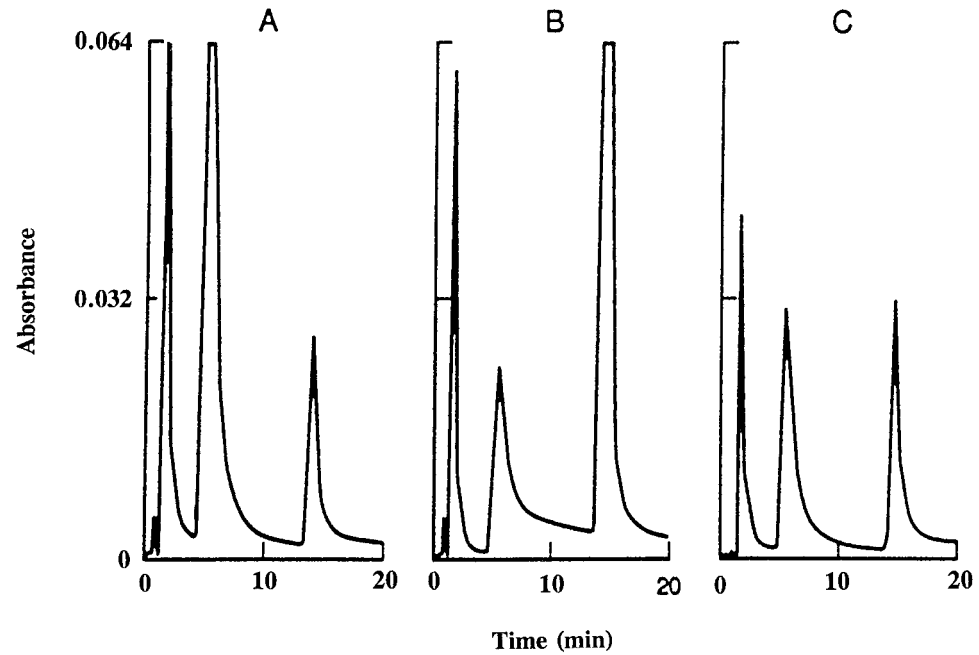
## Lectine usate per la purificazione di glicoproteine

Acronym, Organism and source	Metal ions required	Sugar specificity	Elution conditions	Useful for binding
Con A ( <i>Canavalia ensiformis</i> ; jack bean seeds)	Ca <sup>2+</sup> , Mn <sup>2+</sup>	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 <sup>2+</sup> , Mn <sup>2+</sup>	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 <sup>2+</sup> , Mn <sup>2+</sup>	α-Man	0.1–0.5 M α-MeMan	Similar to LCA/LCH
WGA ( <i>Triticum vulgare</i> ; wheat germ)	Ca <sup>2+</sup> , Mn <sup>2+</sup>	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 pomatia</i> ; albumin gland of edible snail)	-	α-GalNAc	0.1–0.5 M GalNAc	Proteins with terminal α-GalNAc or GalNAcα-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 <sup>2+</sup> , Ca <sup>2+</sup>	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.

Fig. 3. Determination of liver and bone-derived isoenzymes of alkaline phosphatase by HPAC, using an immobilized wheat germ agglutinin column for 50- $\mu$ L injections of serum from patients with liver (A) or bone (B) disease, and healthy individuals (C).

The peaks at 5.6–5.7 min and 15.0–15.2 min are produced by the liver- and bone-derived isoenzymes, respectively. Adapted with permission from Gonchoroff et al. (21).



# GST tagged purification

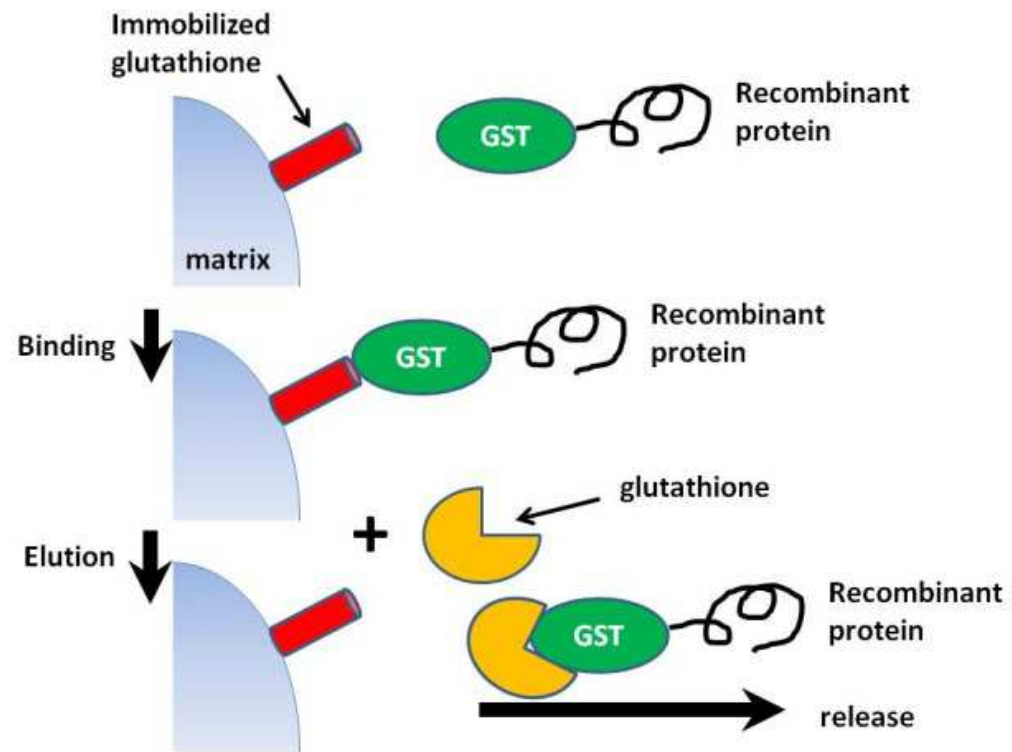
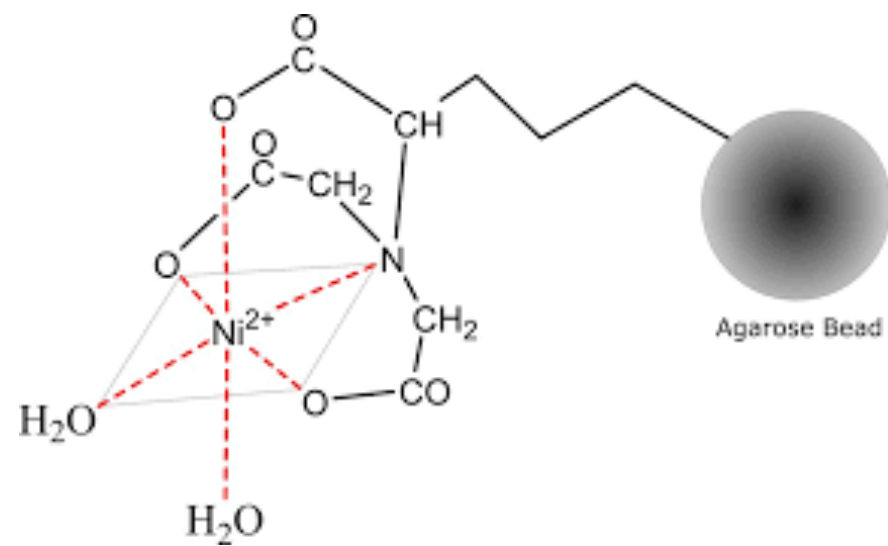
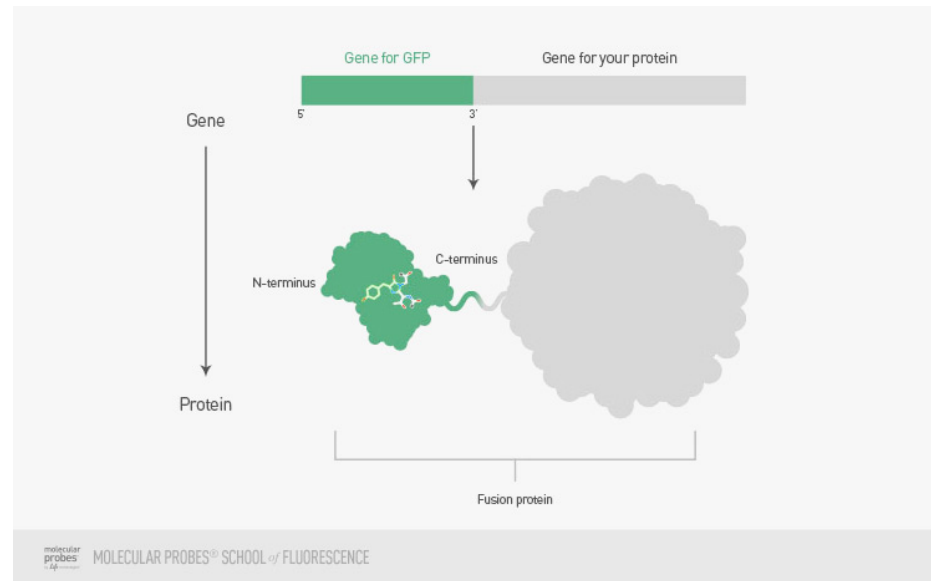
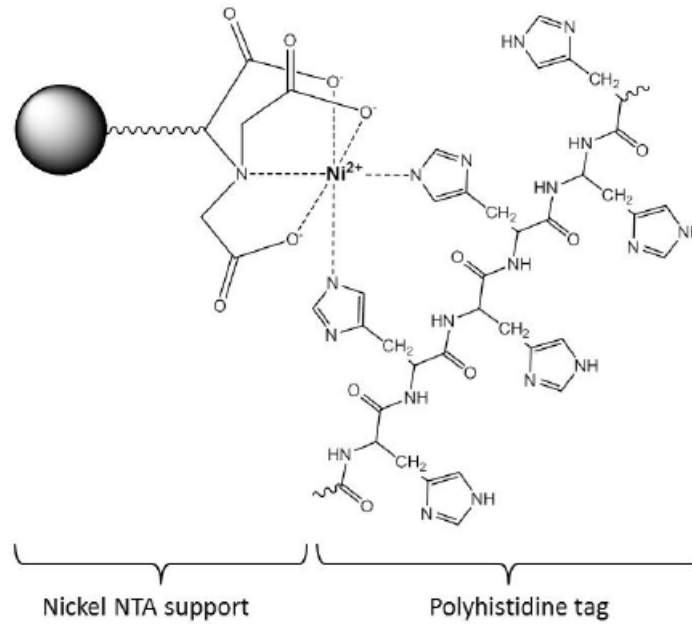
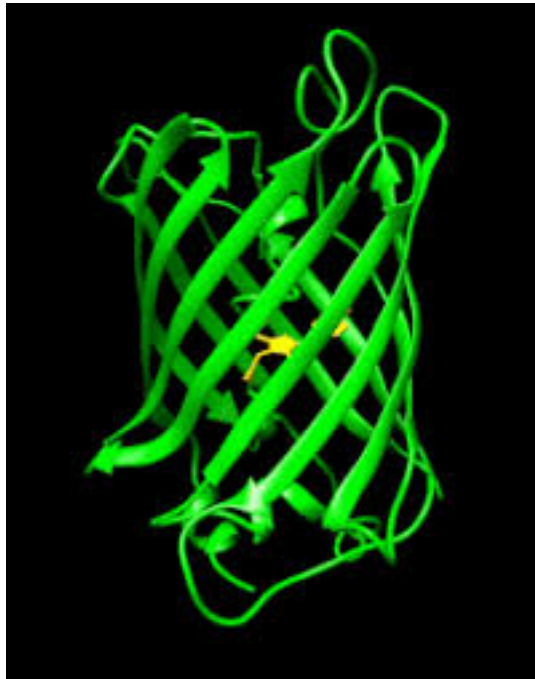


Fig. 11. GST- tagged protein immobilization.





**Alta selettività**  
**Alta risoluzione**

