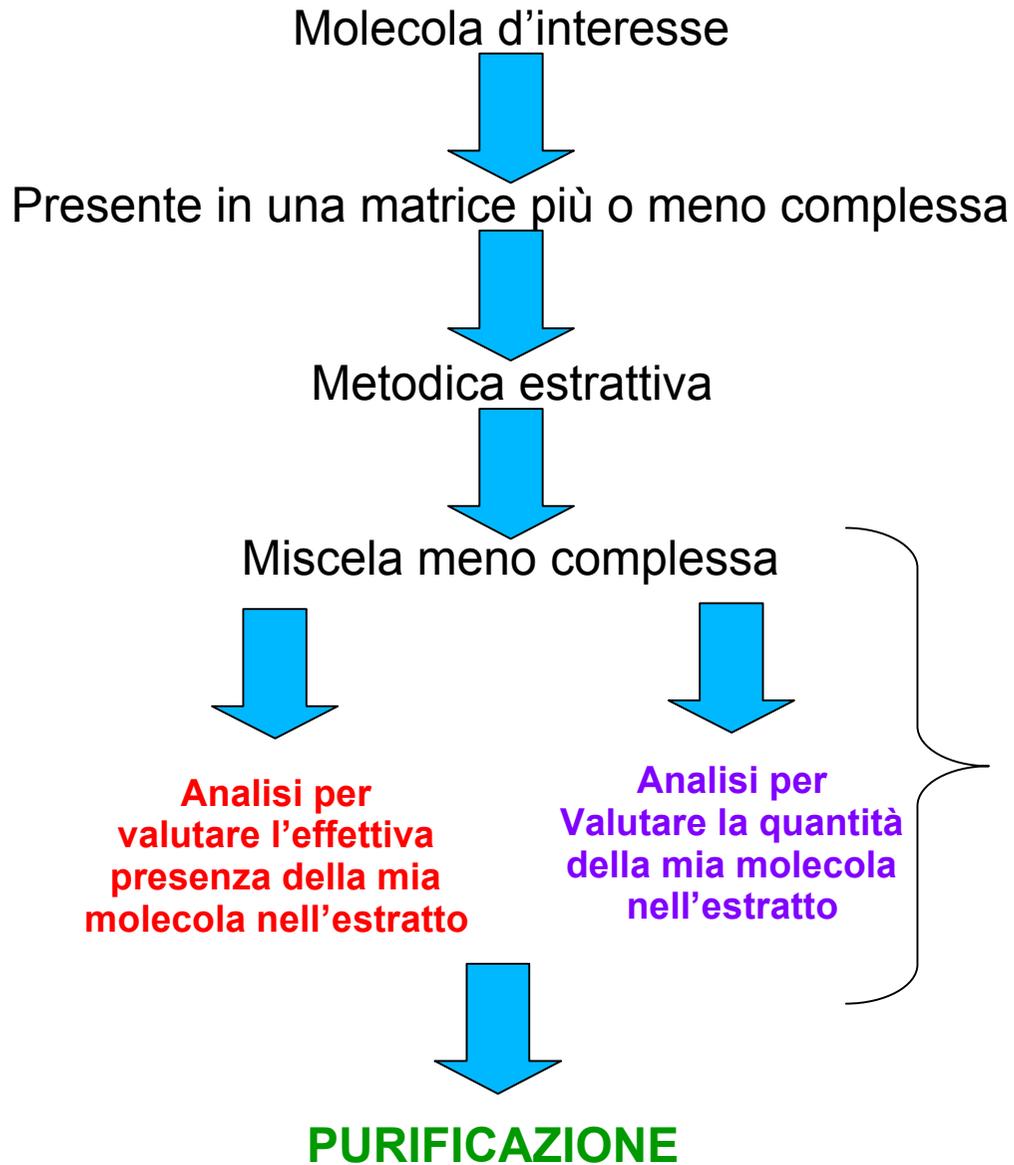


CROMATOGRAFIA



La cromatografia come l'elettroforesi è una metodica analitica separativa. Essa consente di separare tra loro molecole sfruttando le loro diverse proprietà chimico/fisiche.

Può essere sfruttata per scopi di prefrazionamento, per analisi di tipo **qualitativo** e **quantitativo** e per scopi **preparativi**.

Cromatografia ed Elettroforesi

Cromatografia

CROMATOGRAFIA

Metodica separativa

Caratteristiche:

Qualitativa

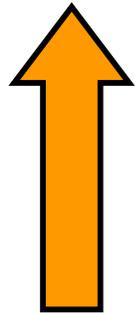
Quantitativa

Preparativa

Cromatografia
liquida

Gas
cromatografia

Cromatografia
fluida
supercritica



Biomolecole
(solubili in
ambiente
acquoso)

Proteine

Peptidi

Acidi nucleici

Vitamine e cofattori

Carboidrati

Lipidi

Ogni singola molecola è contraddistinta da sue proprie e peculiari caratteristiche:
Peso molecolare (ingombro sterico)
Presenza/assenza di gruppi ionizzabili
Presenza/assenza di regioni idrofobiche
Struttura tridimensionale
Solubilità in determinati solventi
...

Cromatografia liquida

In colonna

Pressione:

- a) Bassa (LPLC)
- b) media (FPLC)
- c) alta (HPLC)

Dipende dal diametro delle particelle che supportano la fase stazionaria (resistenza al passaggio della fase mobile: più piccole sono le particelle che supportano la fase mobile maggiore è la resistenza che il sistema offre al passaggio di un flusso)

In “provetta”

Comprende prevalentemente processi cromatografici che sfruttano interazioni molto specifiche tra le molecole e la fase stazionaria – **cromatografia d'affinità**
Selettività **estrema** verso le molecole che possono legarsi alla fase stazionaria (GST-pull down, Co-IP, ChIP, etc)

Planare

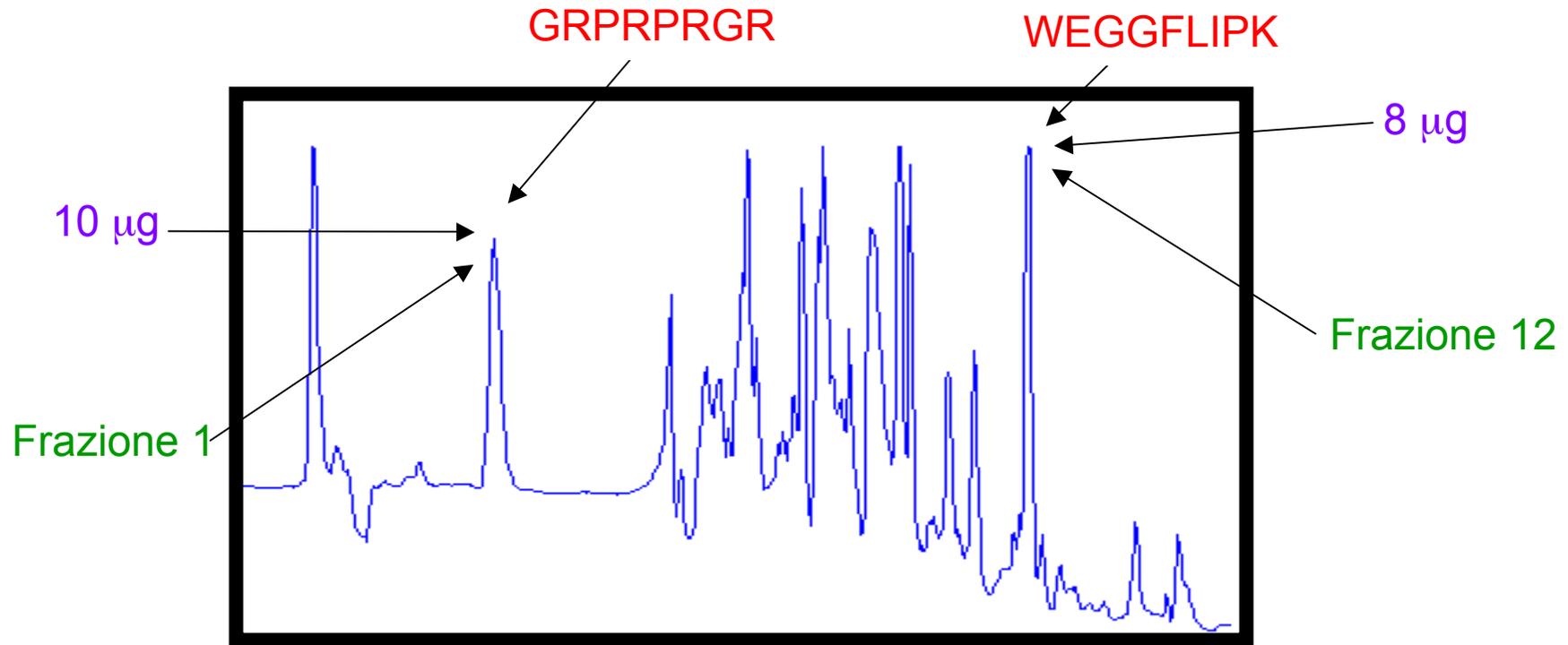
Su strato sottile o su carta Metodica molto diffusa fino a 10 anni fa. Recentemente viene impiegata solo in particolari applicazioni

Tipi di cromatografia liquida

- Adsorbimento (dell'analita sulla fase stazionaria - solido (FS) / liquido (FM))
- Ripartizione (dell'analita nella fase stazionaria - liquido (FS) / liquido (FM))
- Scambio ionico
- Affinità
- Esclusione
- Chirale

Si differenziamo in base al principio secondo il quale avviene la separazione cromatografica
(fase stazionaria / fase mobile)

Cromatografia liquida - Cromatogramma



Qualitativa



Informazione circa l'identità dei componenti di una miscela (basato sul tempo di ritenzione e su informazioni derivanti dal particolare tipo di detector utilizzato)

Quantitativa



Informazioni circa la quantità assoluta dei componenti (tramite opportune curve di calibrazione basate o sull'altezza dei picchi cromatografici o sulla loro area è possibile risalire alla quantità di materiale separato)

Preparativa

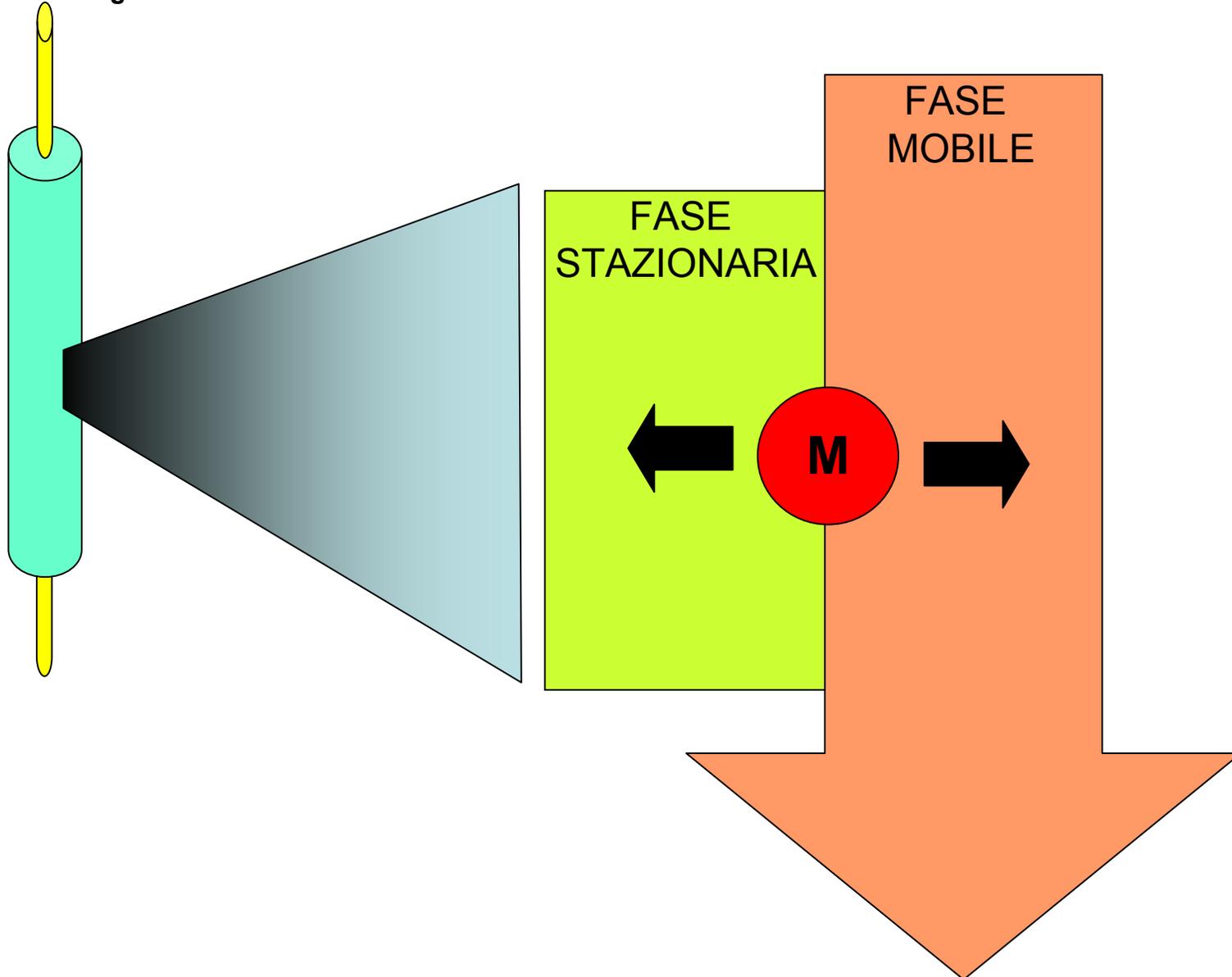


Possibilità di recuperare i componenti purificati (la cromatografia è una tecnica analitica in cui le molecole ad un certo punto escono dalla colonna cromatografica o possono essere selettivamente staccate dalla fase stazionaria e possono essere recuperate)

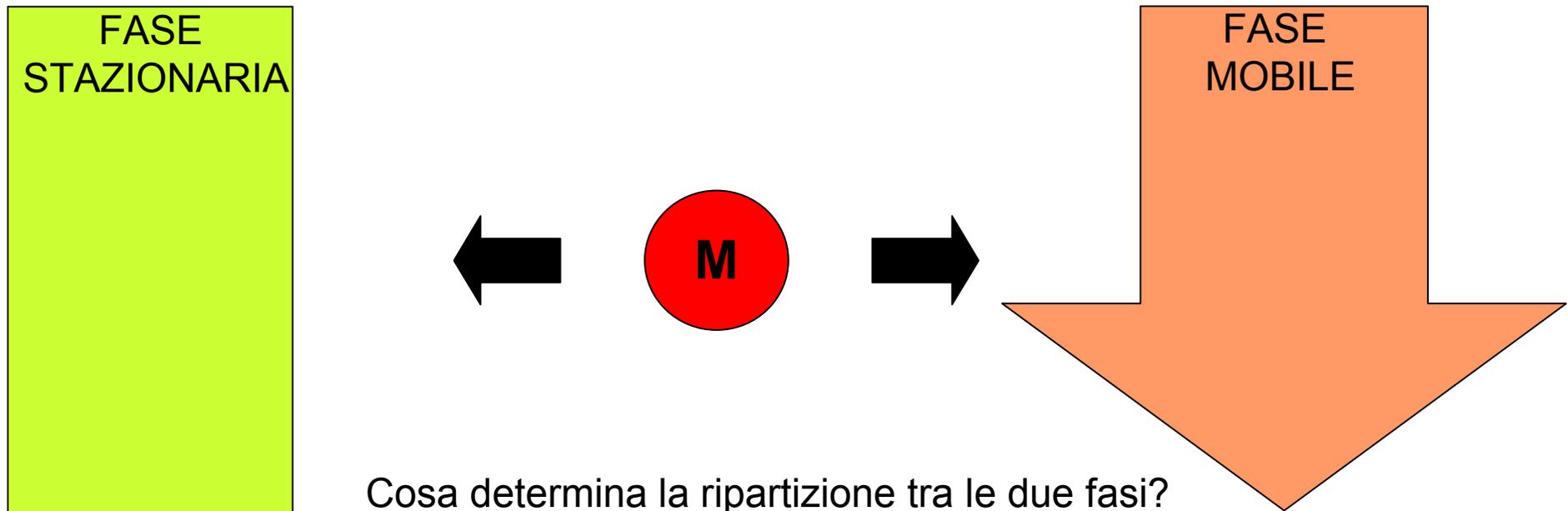
Cromatografia liquida - metodica separativa

I costituenti di una miscela vengono separati attraverso il passaggio in una colonna cromatografica che contiene una fase stazionaria (definita così perché è fissa) sulla quale viene fatta scorrere una fase mobile

Colonna cromatografica



Cromatografia liquida - ripartizione tra FM e FS



Cosa determina la ripartizione tra le due fasi?

1) **Le interazioni che si stabiliscono fra le molecole e le due fasi**

INTERAZIONI di TIPO **NON COVALENTE**

Legami idrogeno

Interazioni elettrostatiche

Forze di van der Waals

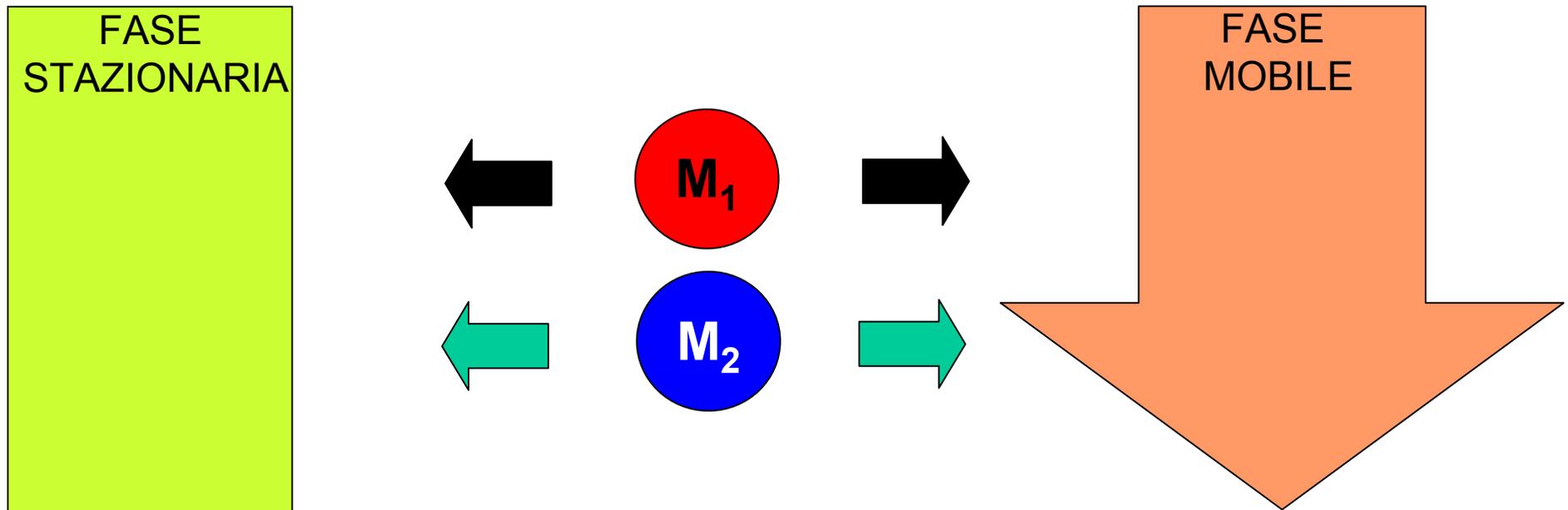
“Interazioni” idrofobiche

2) **L’accessibilità differenziale alla fase stazionaria**

(solo nella cromatografia d’esclusione o gel permeation)

Dimensioni delle molecole

Cromatografia liquida - ripartizione tra FM e FS



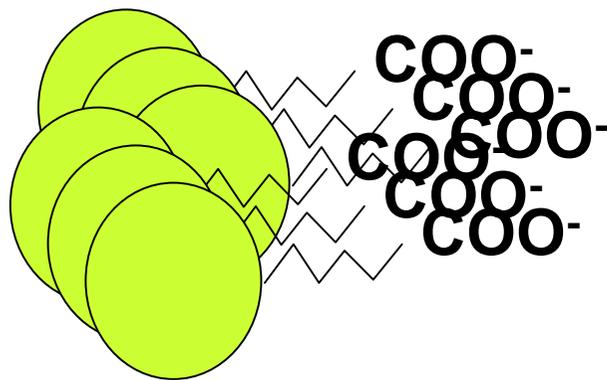
Perché e quando due molecole si separano?

Perché le interazioni e/o l'accessibilità della molecola M_1 con le due fasi (STAZIONARIA e MOBILE) sono diverse rispetto a quelle della molecola M_2

Cromatografia liquida - ripartizione tra FM e FS

FASE
STAZIONARIA

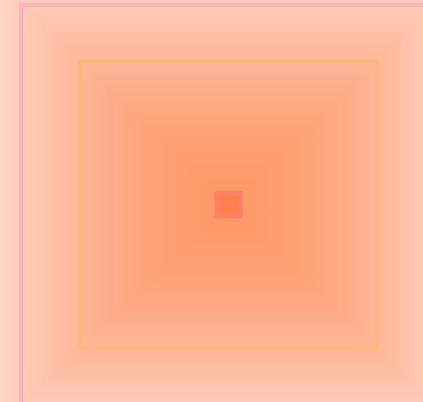
FASE
MOBILE



Gruppi carbossilici immobilizzati
(pKa: 4)

PRGKKRGK
5+ / 1-

GGILVFTEDD
1+ / 4-



H₂O con tampone fosfato pH 7.4

Cromatografia liquida - ripartizione tra FM e FS

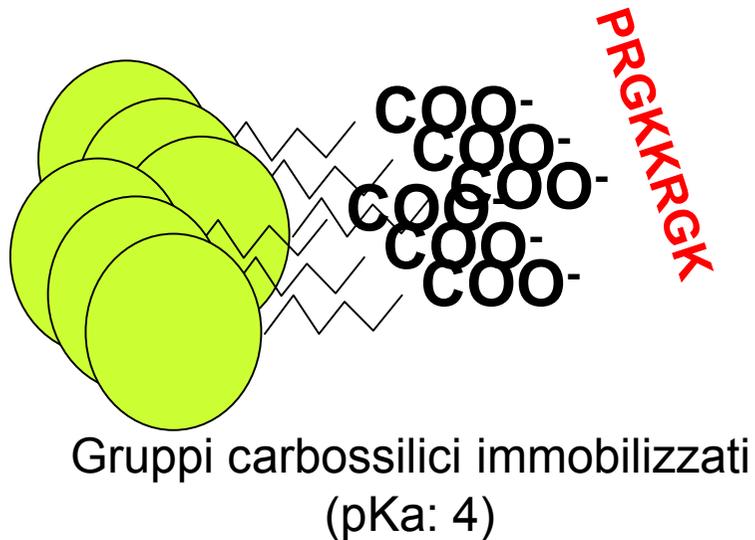
Coefficiente di Distribuzione (K_D)

$$K_D = [M]_s / [M]_m$$

Nelle condizioni indicate precedentemente si può ritenere che:

PRGKKRGK => $K \gg 1$ – alta “affinità” per la fase stazionaria
(ovvero sarà prevalentemente legato alla fase stazionaria)

GGILVFTEDD => $K \ll 1$ – bassa “affinità” per la fase stazionaria
(ovvero sarà prevalentemente presente nella fase mobile)



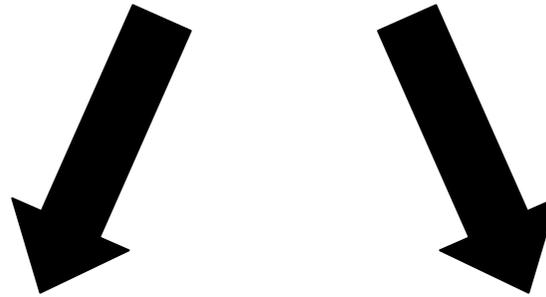
H₂O con tampone fosfato pH 7.4

GGILVFTEDD

Cromatografia liquida - ripartizione tra FM e FS

Coefficiente di Distribuzione (K_D)

$$K_D = [M]_s / [M]_m$$



FISSO nel TEMPO

VARIABILE nel TEMPO

Sistema cromatografico fisso nel tempo
FASE MOBILE e FASE STAZIONARIA
non cambiano

Sistema cromatografico variabile nel tempo
FASE MOBILE e FASE STAZIONARIA
cambiano

CROMATOLOGRAFIA di TIPO

ISOCRATICA

IN GRADIENTE

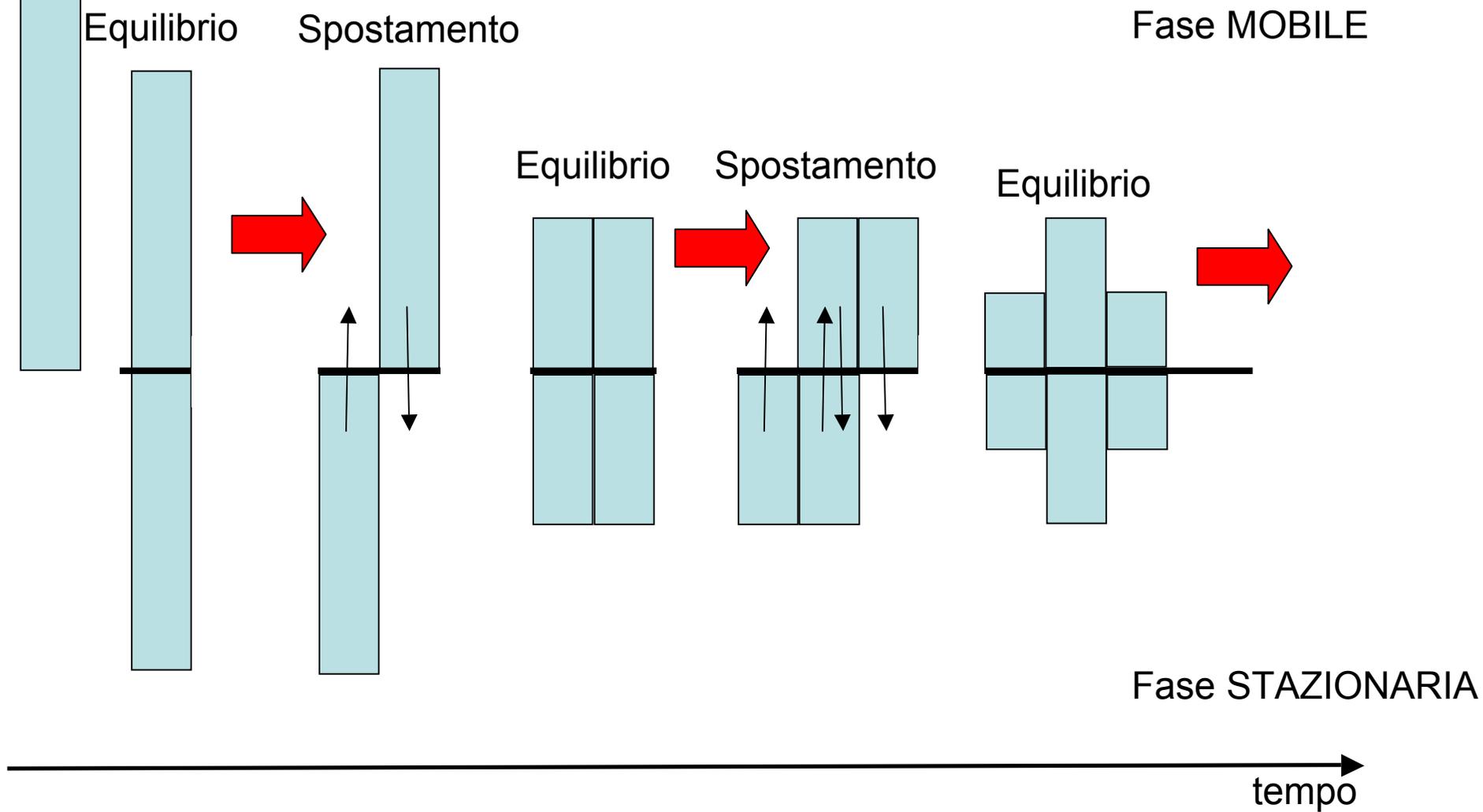
L'entità delle interazioni che si stabiliscono tra le fase mobile e stazionaria e le molecole

Rimangono **invariate** nel tempo

Si **modificano** nel tempo

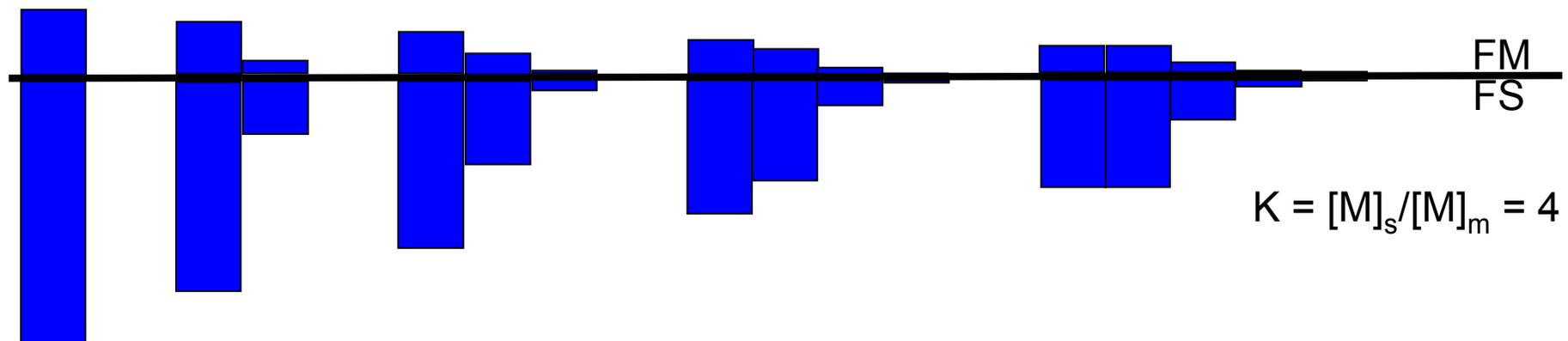
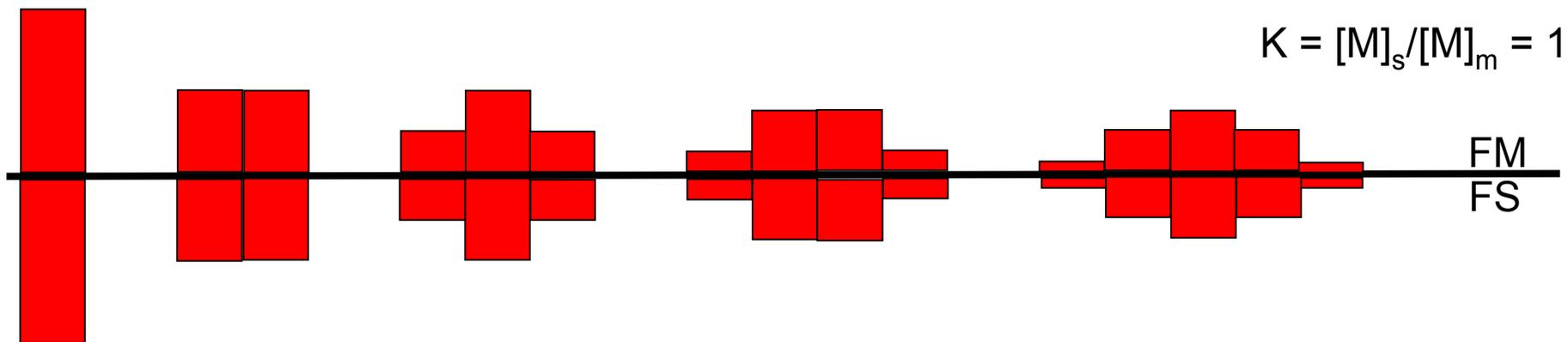
Cromatografia liquida - ripartizione tra FM e FS (una visione semplificata)

$$K_D = [M]_s/[M]_m = 1$$

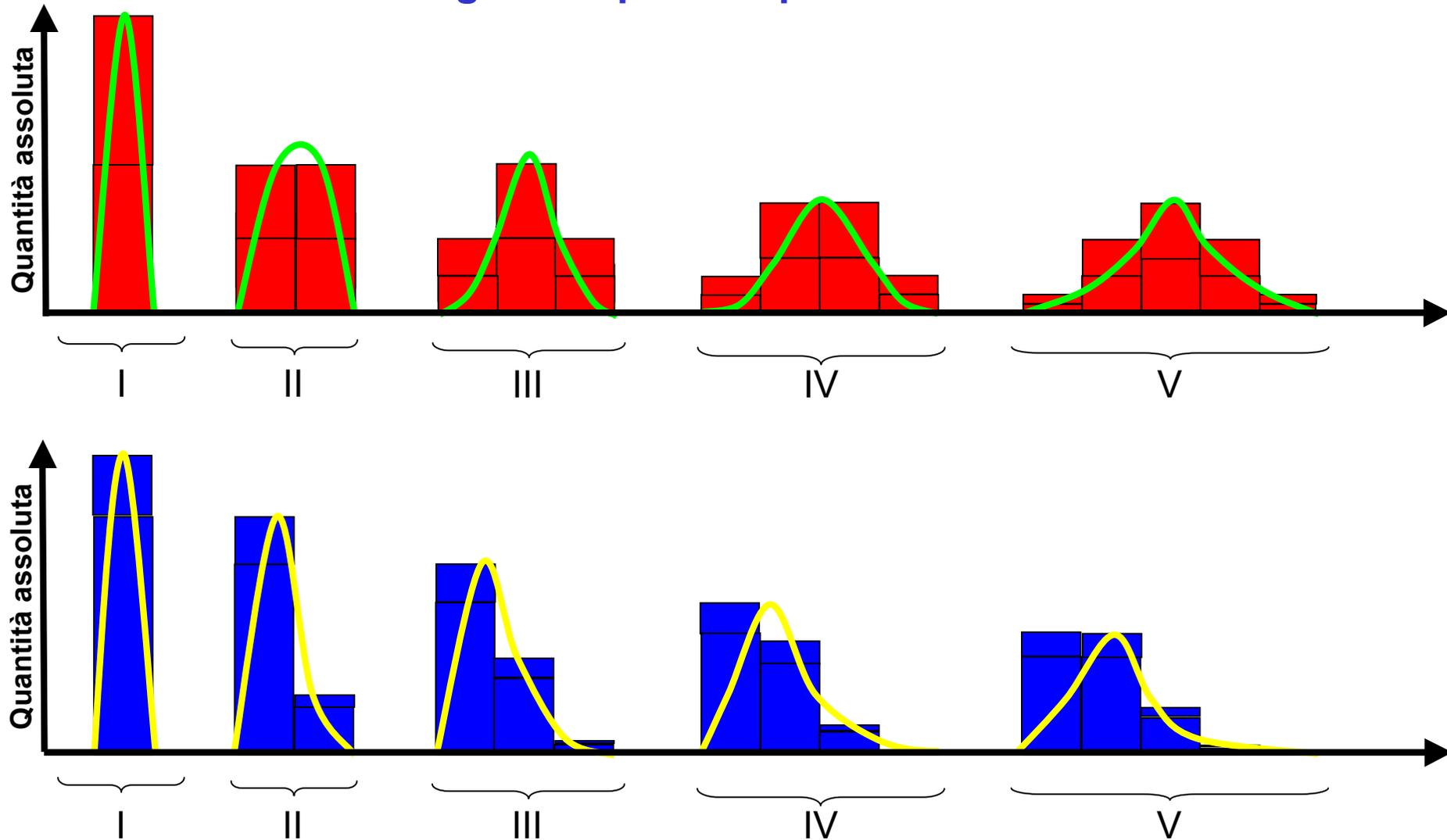


Cromatografia liquida - ripartizione tra FM e FS

- confronto tra K_d diversi: 1 vs 4 -



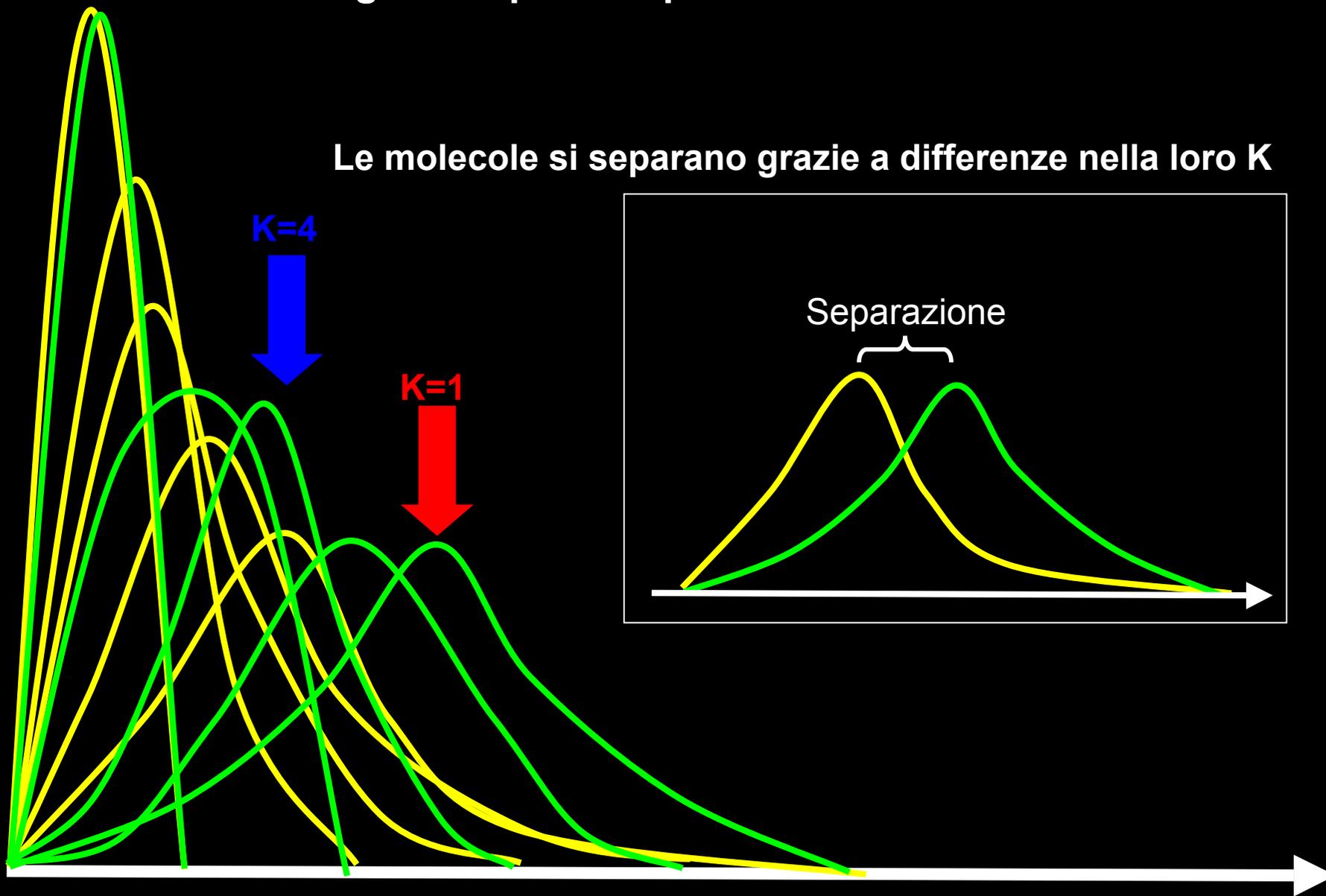
Cromatografia liquida - ripartizione tra FM e FS



In questo esempio le quantità della stessa molecola presenti nella fase mobile e nella fase stazionaria nel medesimo spazio all'interno della colonna sono riportate come istogrammi. Le molecole nella fase mobile istante dopo istante si spostano e sono soggette ad una nuova equilibratura tra FS e FM la cui entità sarà governata dal loro K_d e dalle molecole che troveranno nella fase stazionaria. NB: ad ogni istante alcune molecole sono nella FS e alcune sono nella FM! La cosa importante da capire è che le molecole con K_d maggiore saranno più "indietro" nella colonna rispetto a quelle con K_d minore.

Cromatografia liquida - ripartizione tra FM e FS

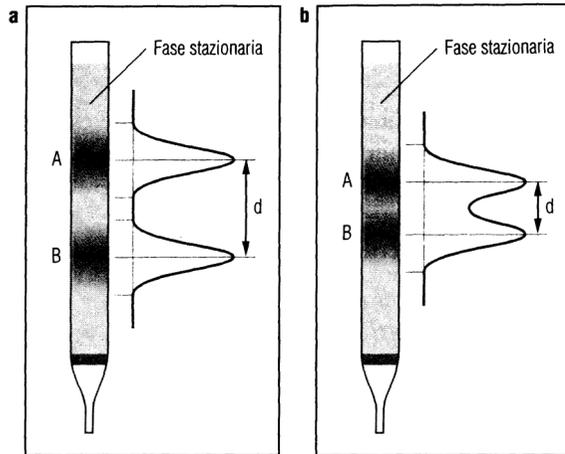
Le molecole si separano grazie a differenze nella loro K



Qualità di una separazione cromatografica

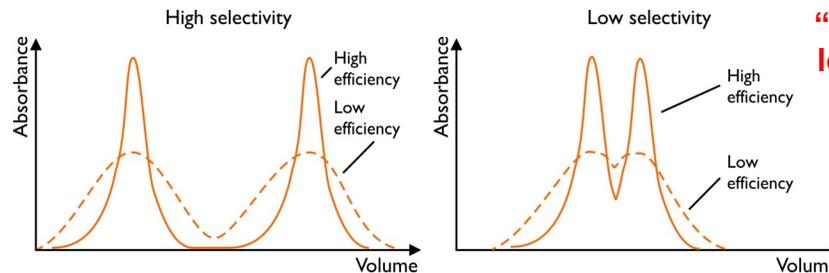
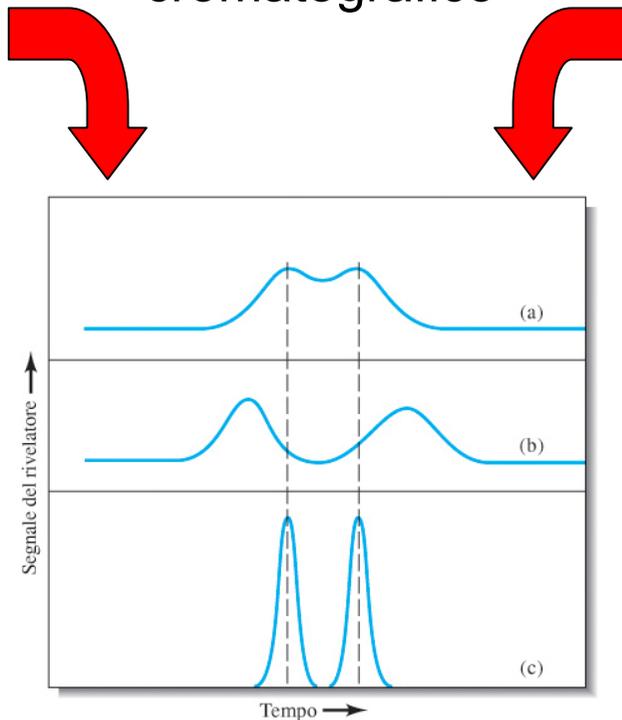
SELETTIVITA'

Capacità di eluire due molecole diverse con tempi di ritenzione il più possibile diversi



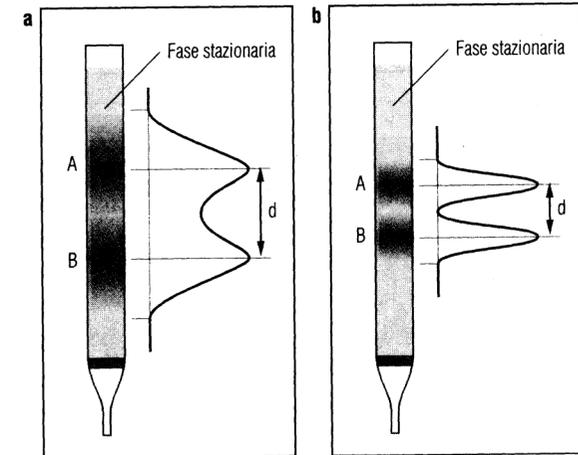
E' influenzata dalle **caratteristiche delle molecole separate** (ma questo è un parametro che non si può modificare) e dal meccanismo della separazione cromatografica (**tipo di fase mobile e fase stazionaria**) ma non dalle caratteristiche costruttive e fisiche della colonna cromatografica. Sostanzialmente **sono i diversi K_D delle molecole in quel particolare processo cromatografico che determinano la selettività.**

OTTIMIZZAZIONE del processo cromatografico



EFFICIENZA

Capacità di eluire molecole identiche con tempi molto simili (in modo da ottenere picchi con una bassa "dispersione")



E' influenzata dalle **caratteristiche delle molecole separate** (ma questo è un parametro che non si può modificare) e dalle **caratteristiche costruttive e fisiche della colonna.**

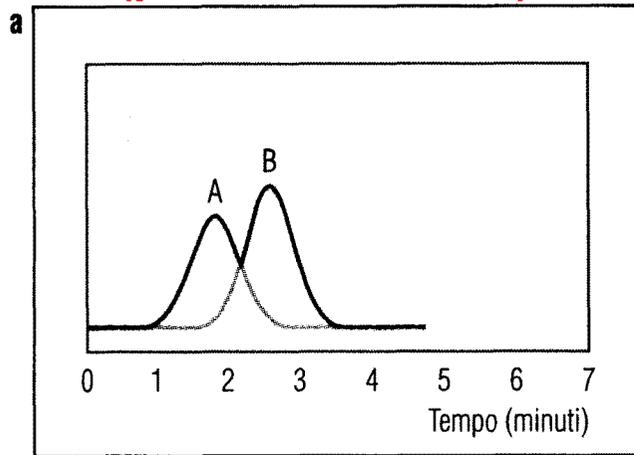
**Da questo parametro dipende anche la sensibilità:
Se le molecole eluiscono "assieme" questo comporta una loro concentrazione più elevata.**

Qualità di una separazione cromatografica

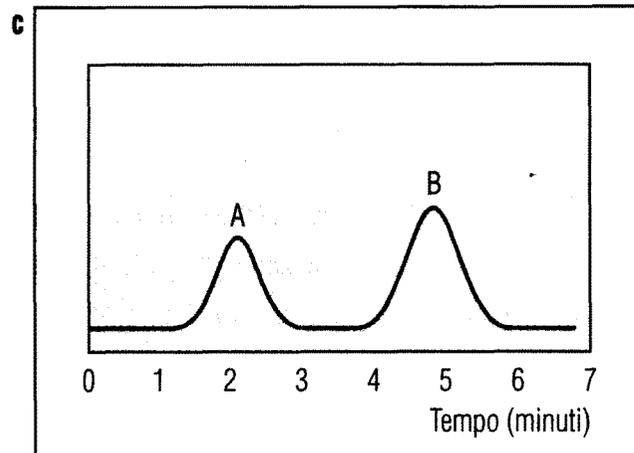
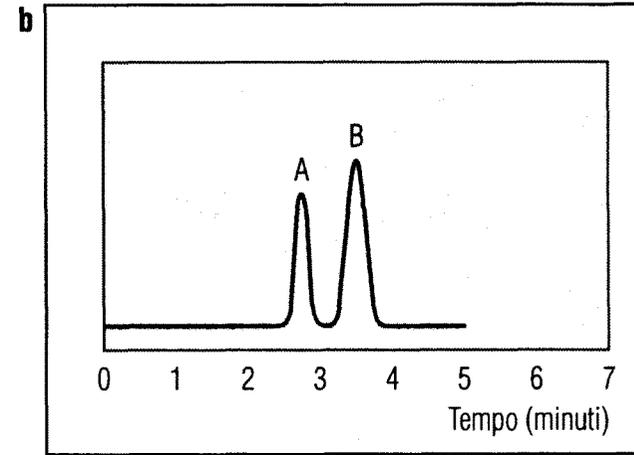
Da un processo cromatografico cosa vogliamo?

Molecole separate (risolte) tra loro nel minor tempo possibile e contemporaneamente un'elevata sensibilità

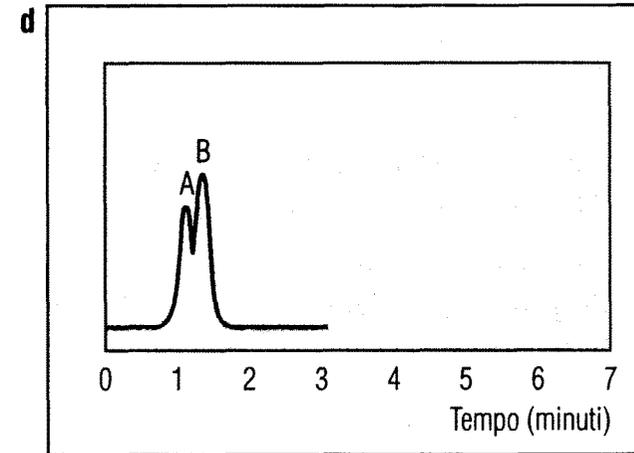
**Bassa selettività ed efficienza
(picchi non risolti)**



Aumento di efficienza



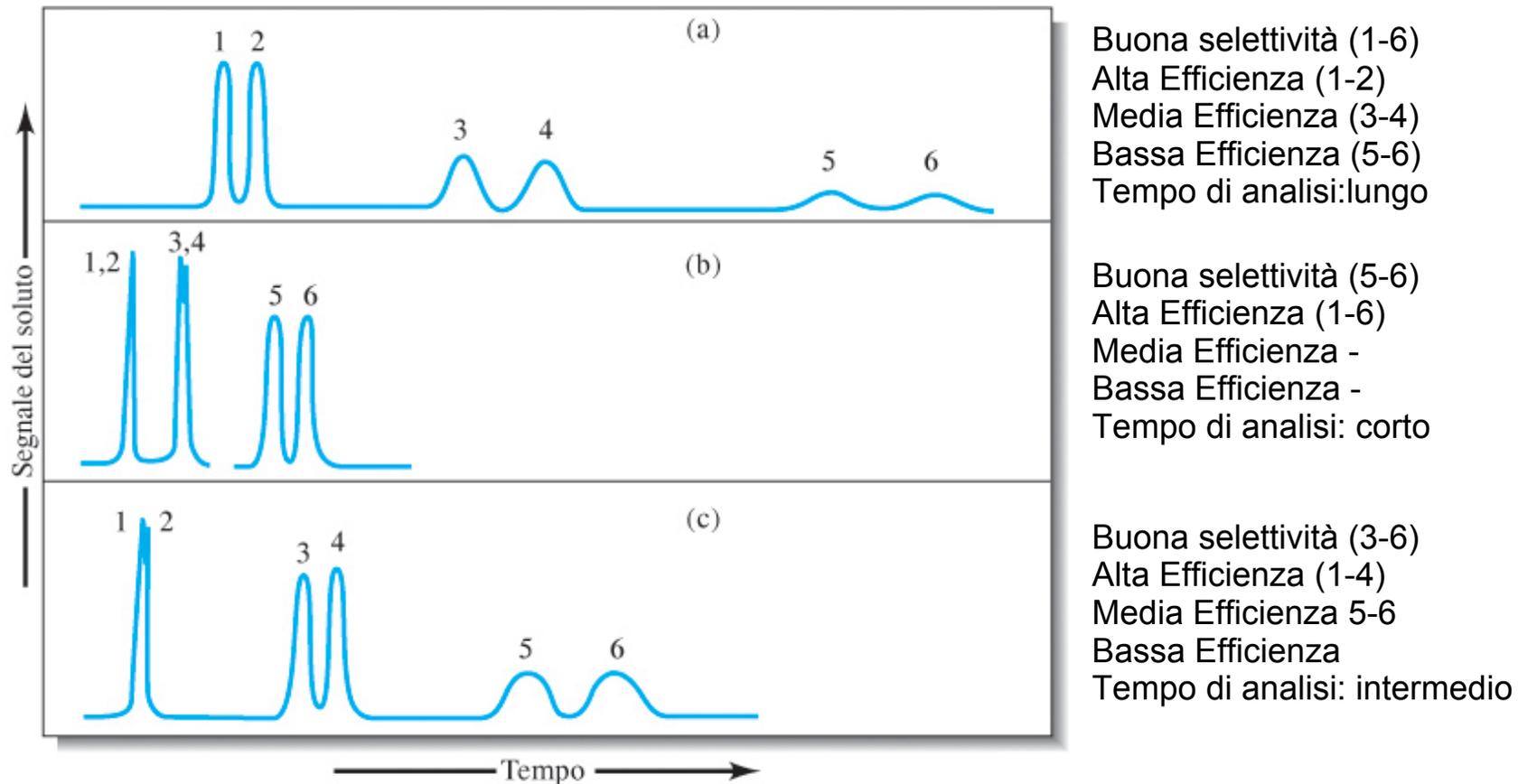
Aumento di selettività



**Aumento di efficienza ma
non di selettività**

Qualità di una separazione cromatografica

...il compromesso cromatografico...



A volte **le caratteristiche fisico chimiche delle molecole sono talmente diverse tra loro che risulta difficile trovare un sistema cromatografico che sia in grado di offrire una buona selettività ed efficienza per tutte le molecole** sottoposte al processo separativo.

Solitamente **in questi casi le analisi cromatografiche effettuate con un gradiente di fase mobile offrono risultati migliori di quelle effettuate in condizioni isocratiche**. E' più facile ottimizzare un processo cromatografico avendo a disposizione la possibilità di variare nel tempo la fase mobile (vedasi oltre).

Cromatografia: alcune definizioni

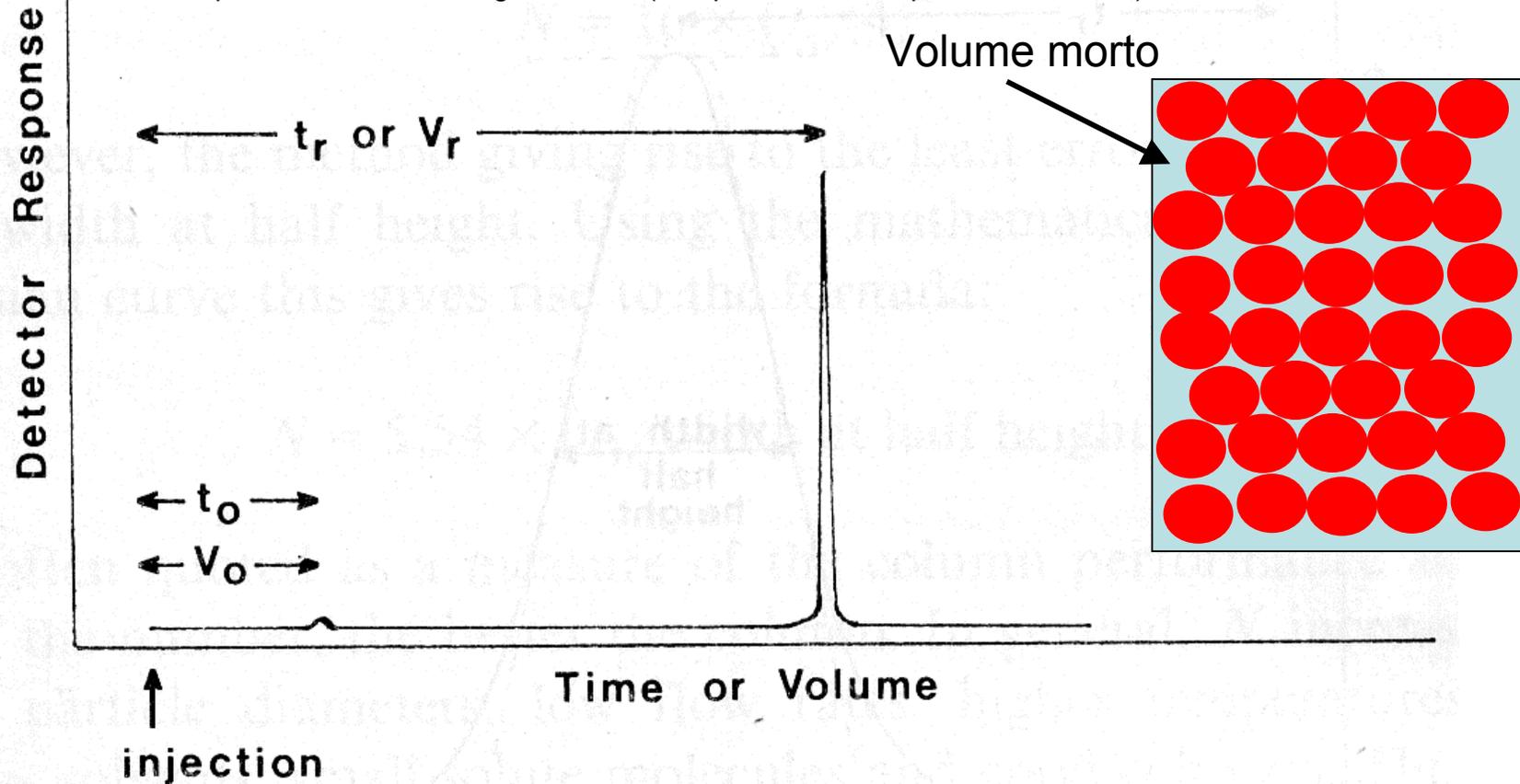
Tempo e volume di ritenzione (T_r e V_r) e volume morto (V_0)

T_r = tempo che una molecola impiega ad uscire dalla colonna cromatografica dopo la sua iniezione

$V_r = T_r \times f$ (f = flusso [volume/tempo])

V_0 = Volume morto della colonna:

volume della colonna (contenitore fisico) – volume del materiale con cui è riempita
In pratica è il volume degli interstizi (compresi eventuali pori della matrice).

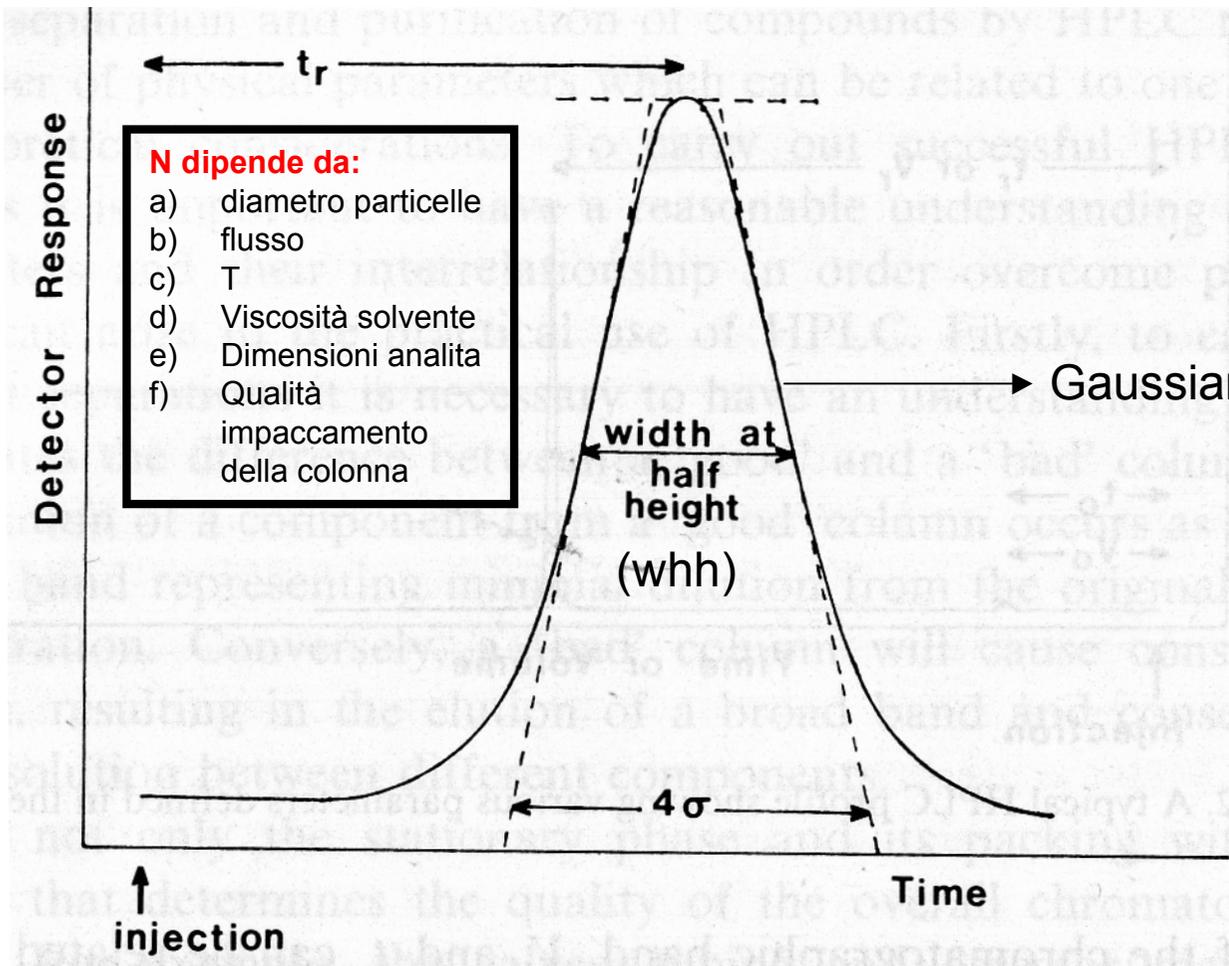


Determinazione del V_0 : Una sostanza che non interagisce in alcun modo con la fase stazionaria ($K_D=0$) viene eluita con il volume morto. (Esempio: NaCl quando si effettua una cromatografia a fase inversa).

Cromatografia: efficienza

L'efficienza di una colonna determina quanto una molecola risulta "dispersa", ovvero quanto **largo** è il picco cromatografico in **funzione** del suo **tempo di ritenzione**. Essa viene indicata con il numero **N** ovvero il numero di "piatti teorici" prendendo a prestito una terminologia propria della distillazione frazionata, **che però spesso crea confusione**. Il numero di "piatti teorici" indica il **numero di ripartizioni** a cui una molecola va incontro e quindi individua una zona discreta della colonna dove questa ripartizione avviene. Resta però un concetto astratto in quanto all'interno della colonna cromatografica **non esiste** alcun piatto e questo modo di riferirsi al numero di piatti teorici serve a noi per semplificare e visualizzare il processo di separazione. Maggiore è il numero N, maggiore è l'efficienza della colonna. Per avere un numero N grande, lo "spazio" in cui una ripartizione avviene deve essere piccolo, da questo deriva il fatto che più piccola è l'altezza di un piatto teorico (HETP - Height Equivalent of a Theoretical Plate), maggiore sarà il numero N e maggiore quindi risulterà l'efficienza della colonna.

In pratica, tanto più un picco è stretto (piccola **whh**), tanto maggiore è l'efficienza della separazione cromatografica per quella specifica molecola sotto indagine, ovvero le molecole viaggiano senza "disperdersi" lungo il loro tragitto.



$$N = (t_r/\sigma)^2$$

... ma anche

$$N = 5.54 \times (t_r/whh)^2$$

Può anche essere valutata l'altezza del piatto teorico (H):
Se L è la lunghezza della colonna =>
 $H = L/N$ (H anche HETP
Height Equivalent of a Theoretical Plate)

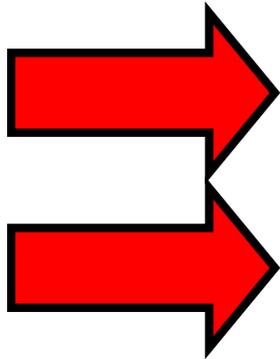
Cromatografia: efficienza - cosa porta una molecola a disperdersi?

Efficienza della colonna (N) dipende da:

- a) Diametro particelle
- b) Flusso (velocità della fase mobile)
- c) Temperatura
- d) Viscosità della fase mobile
- e) Dimensioni analita
- f) Qualità impaccamento della colonna
- g) Dimensioni della colonna (lunghezza)

Una molecola all'interno di una colonna va incontro ad una serie di ripartizioni.

Ricordiamoci che la molecola si trova a ripartirsi mentre è soggetta al flusso della fase mobile, ovvero quando è nella fase mobile, essa si sposta. In teoria, proviamo ad immaginare che quando è nella fase mobile deve essere velocemente sottoposta ad un altro equilibrio altrimenti è portata via dalla "corrente". Quando è nella corrente, tutto quello che succede alla molecola e che in qualche modo ne altera il percorso e il raggiungimento dell'equilibrio (che in pratica non si raggiunge mai), influisce sull'efficienza della separazione.



DIFFUSIONE di EDDY (trasversale o percorsi/vie alternativi)
DIFFUSIONE LONGITUDINALE

PROCESSI di TRASFERIMENTO di MASSA

Equazione di van Deemter

Relazione tra i parametri sopra citati e l'altezza del piatto teorico

NB: tanto più piccolo è il valore dell'altezza del piatto teorico tanto maggiore è il numero piatti teorici (N) di una colonna

$$HETP = A + \frac{B}{\mu} + C\mu$$

$$C = C_s + C_m$$

$$HETP = A + \frac{B}{\mu} + C_s\mu + C_m\mu$$
$$= H_{mp} + H_{LD} + H_{sp} + H_{mp}$$

μ = velocità lineare della fase mobile

H_{mp} = contributo dato dalle **vie alternative** all'interno della colonna

H_{LD} = contributo dato dalla **diffusione longitudinale**

H_{sp} e H_{mp} = contributo dato dal **trasferimento di massa** dalla fase stazionaria alla fase mobile e viceversa - legato al tempo di equilibrizzazione.

Efficienza della colonna (N) dipende da:

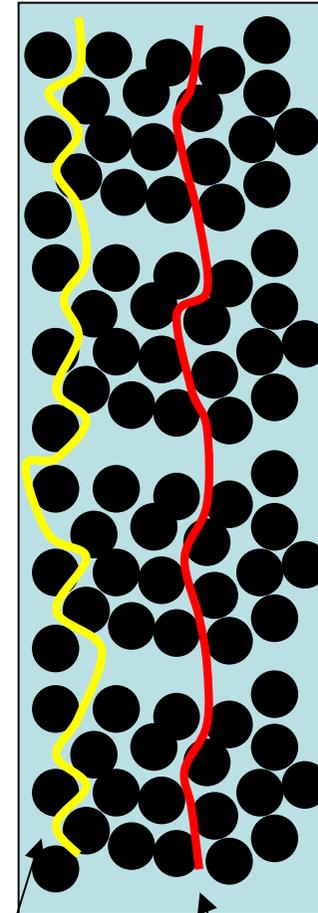
- a) diametro particelle (d_p)
- b) Flusso (velocità della fase mobile)
- c) T
- d) Viscosità della fase mobile
- e) Dimensioni analita
- f) Qualità impaccamento della colonna (λ)
- g) Dimensioni della colonna (lunghezza)

$$H_{mp} = 2\lambda d_p$$

diffusione di Eddy o multiple pathway (mp)

Colonne con un **impaccamento molto uniforme** presentano percorsi al loro interno sostanzialmente identici e questo comporta che le molecole non vanno incontro ad una dispersione dovuta al fatto di seguire percorsi diversi in lunghezza. Minore è il diametro delle particelle e maggiore è il loro grado di omogeneità (in termini di regolarità di forma e dimensioni) migliore è l'impaccamento della colonna.

Diffusione di Eddy



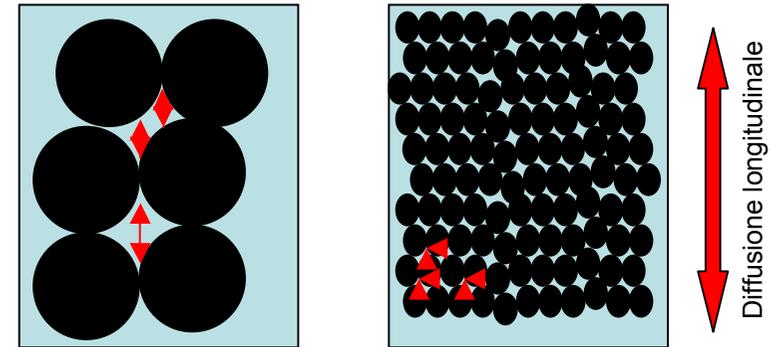
“impiega più tempo ad uscire”

“impiega meno tempo ad uscire”

Efficienza della colonna (N) dipende da:

- a) diametro particelle (d_p)
- b) Flusso (velocità della fase mobile)
- c) T
- d) Viscosità della fase mobile
- e) Dimensioni analita
- f) Qualità impaccamento della colonna (λ)
- g) Dimensioni della colonna (lunghezza)

Diffusione longitudinale



Le molecole tendono a diffondere (allargamento del picco), e diffondono in maggior misura tanto più permangono all'interno della colonna (dipendenza del flusso) e tanto più spazio hanno per diffondere (caratteristiche fisiche della colonna) e tanto maggiore è il loro coefficiente di diffusione nel mezzo (fase mobile)

$$H_{LD} = 2\psi D_m / \mu$$

ψ - Fattore di tortuosità – rappresenta quanto la diffusione delle molecole è stericamente impedita dalla presenza del riempimento solido (particelle) della colonna. Tanto minore quanto più è riempita la colonna => tanto più piccole sono le particelle e tanto maggiore è il loro grado di omogeneità

D_m – Coefficiente di diffusione del soluto nella fase mobile: $D_m = kT / 6\pi\eta r$

k - costante di Boltzman, T - Temperatura, η - viscosità della fase mobile, r - raggio della molecola

μ - velocità lineare della fase mobile (incide sul tempo di eluizione di una molecola: maggiore è il flusso prima la molecola esce dalla colonna e meno tempo ha per diffondere)

Efficienza della colonna (N) dipende da:

- a) diametro particelle (d_p)
- b) Flusso (velocità della fase mobile)
- c) T
- d) Viscosità della fase mobile
- e) Dimensioni analita
- f) Qualità impaccamento della colonna (λ)
- g) Dimensioni della colonna (lunghezza)
- h) ...altri fattori

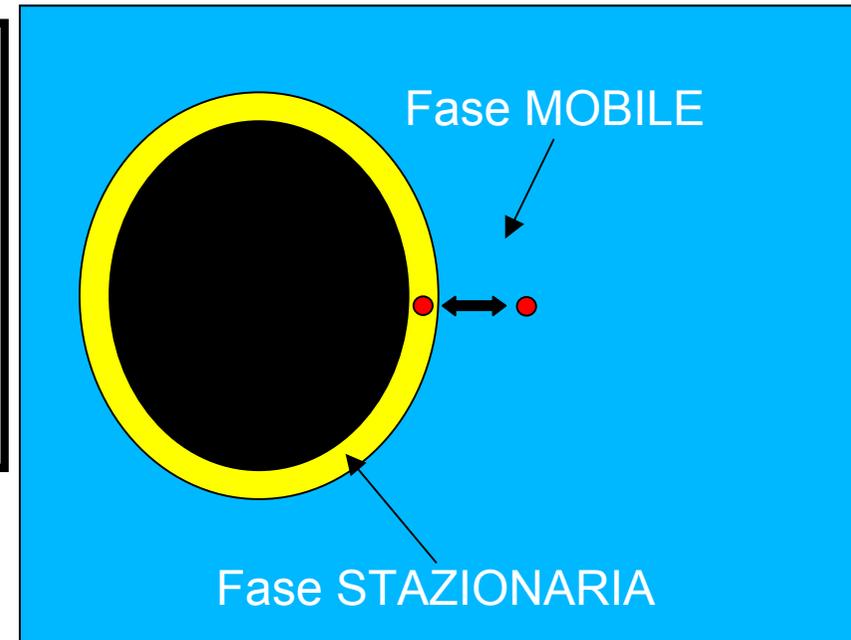
$$H_{sp} = [qk'd_f^2 / (1+k')D_s] \mu$$

- q – fattore di configurazione (forma della fase stazionaria)
- k' – fattore di capacità $(V_r - V_0)/V_0$ - legato alla velocità dell'analita
- d_f – spessore della fase stazionaria
- D_f – coefficiente di diffusione del soluto nella fase stazionaria
- μ – velocità lineare della fase mobile

$$H_{mp} = [\omega d_p^2 / D_m] \mu$$

- ω – coefficiente legato principalmente all'impaccamento della colonna e al suo diametro
- d_p – diametro delle particelle

- D_m – coefficiente di diffusione del soluto nella fase mobile
- μ – velocità lineare della fase mobile



Resistenza al trasferimento di massa

Raggiungimento dell'equilibrio FS/FM non è istantaneo.

Tanto più è lento, tanto maggiore sarà la dispersione della molecola. Ovviamente tanto maggiore è il flusso, tanto più pronunciato è l'effetto dell'allargamento del picco dovuto a questo effetto, ovvero al non raggiungimento del punto di equilibrio dei processi di ripartizione.

La FM e FS non possono essere considerate delle fasi planari senza una "profondità". Le molecole si muovono al loro interno ma per effettuare la ripartizione devono prima collocarsi in prossimità dell'interfaccia FM/FS.

Per minimizzare la dispersione del picco cromatografico è necessario scegliere condizioni che portano ad avere un'altezza del piatto teorico minore, ovvero avere un numero N il più elevato possibile.

⇒ Tipo di colonna e suo impaccamento

⇒ Tipo di solventi utilizzati

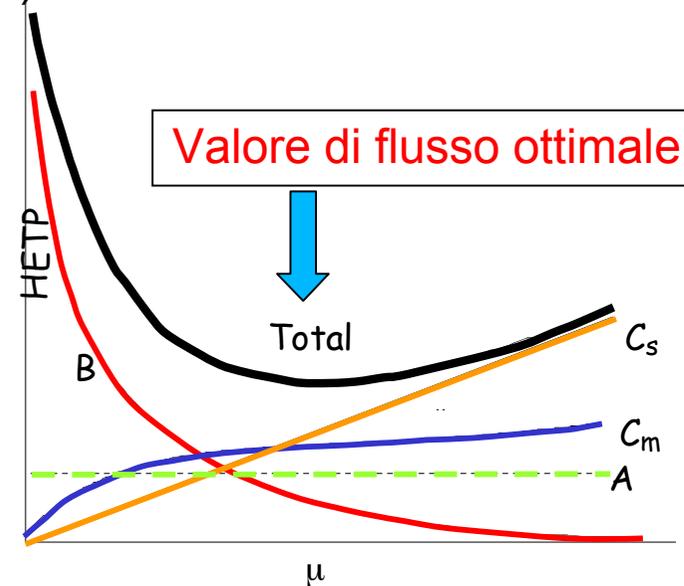
⇒ ...

Ma a volte non è possibile modificare il sistema fisico con il quale viene effettuata la separazione cromatografica (colonne e solventi a volte sono obbligati).

⇒ Uno dei parametri che è più facilmente modificabile è il flusso al quale avviene la separazione cromatografica (μ).

$$\text{HETP} = A + \frac{B}{\mu} + C\mu$$

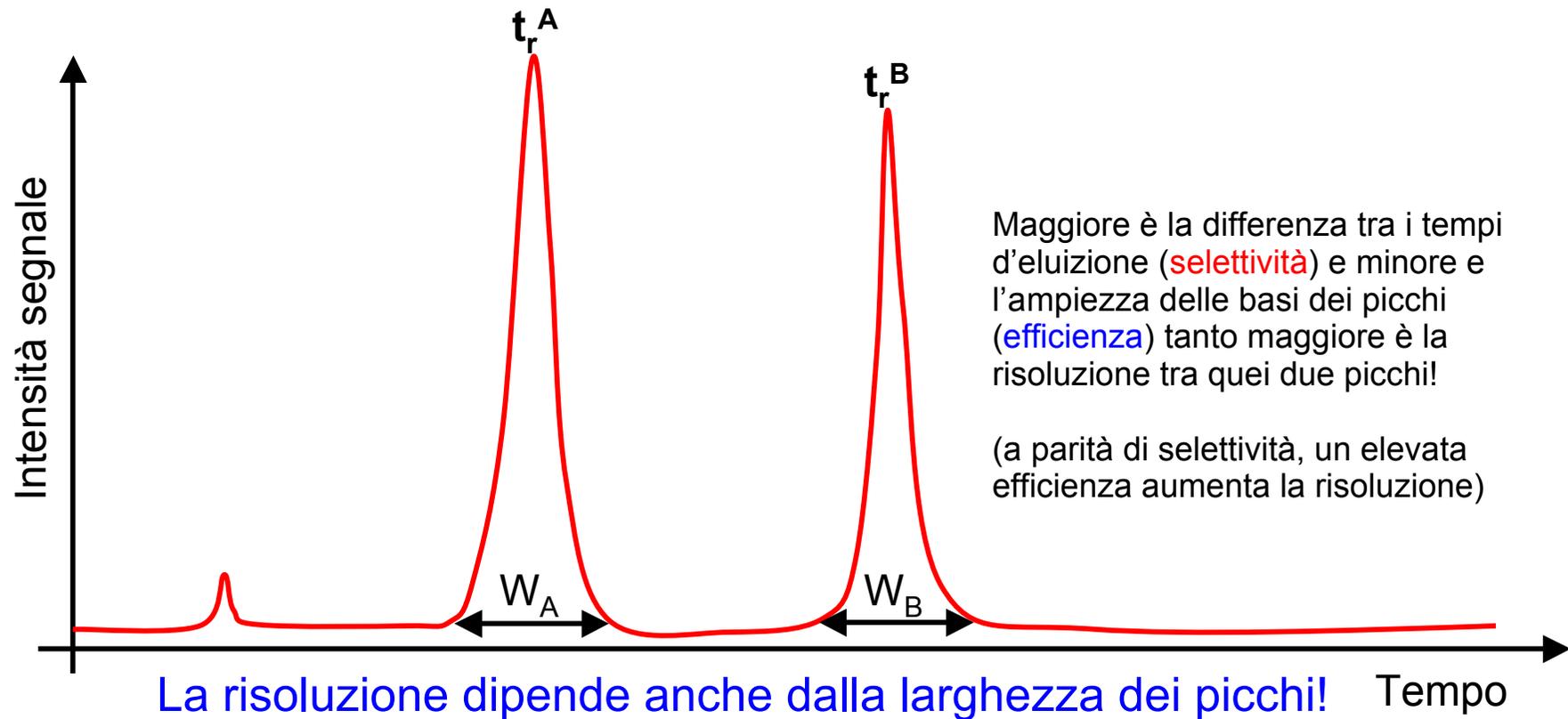
**Può essere identificato il valore di flusso per quel determinato sistema cromatografico per il quale si ottiene il più piccolo valore per HETP.
=> migliore risoluzione**



Perché è necessario effettuare separazioni cromatografiche nelle quali la dispersione dei picchi è minima?

A) Perché solitamente vengono analizzate miscele complesse ed è necessario che i composti d'interesse siano **separati (risolti)** uno dall'altro.

$$R_s \text{ (risoluzione)} = \frac{t_r^B - t_r^A}{[(W_A + W_B)/2]}$$



B) Perché la sensibilità del metodo analitico aumenta se i composti sono separati con un'elevata efficienza: alta efficienza => alta concentrazione => alta sensibilità