

LAVORARE CON LE PROTEINE

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

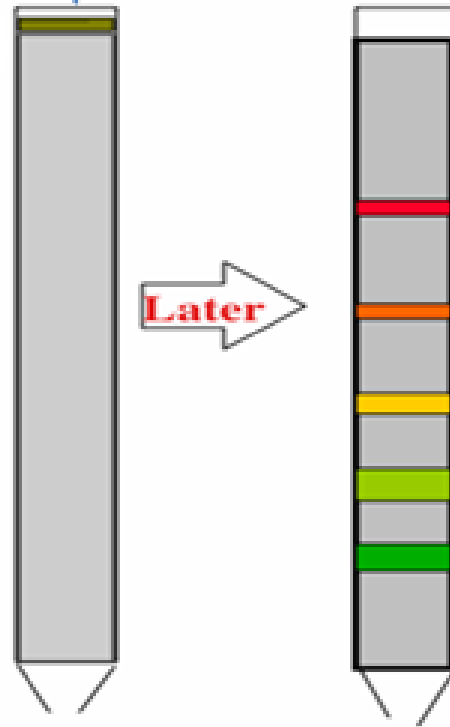
Scoperta nel 1906 - Mikhail Tswett
Botanico russo



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 (CaCO_3)



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.

CROMATOGRAFIA

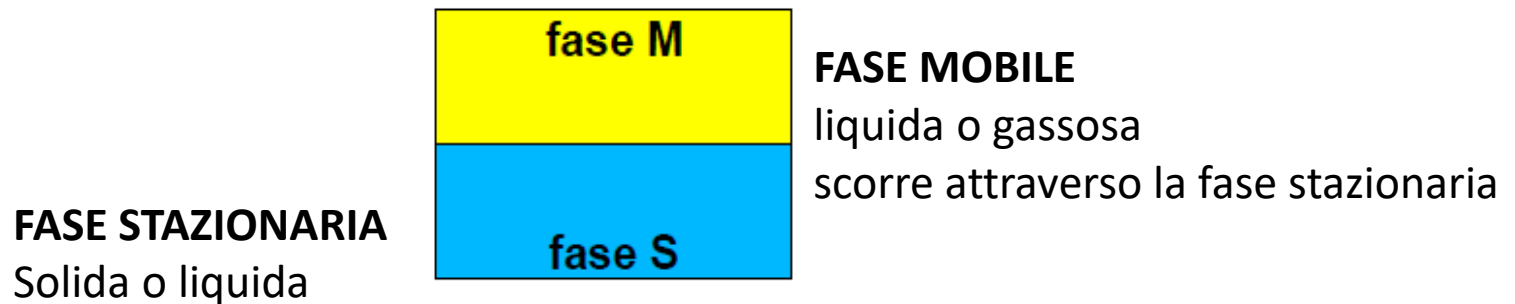
La cromatografia indica un insieme di tecniche che servono a separare una miscela di molecole nei suoi componenti, con scopi qualitativi e quantitativi. **Versatile ed efficace.**

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.**



COEFFICIENTE DI DISTRIBUZIONE

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



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

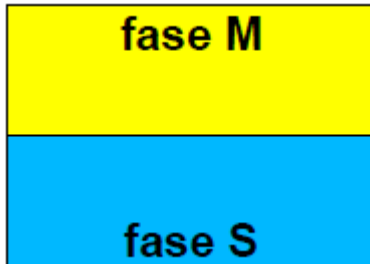
C = concentrazione analita

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

K_d

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

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

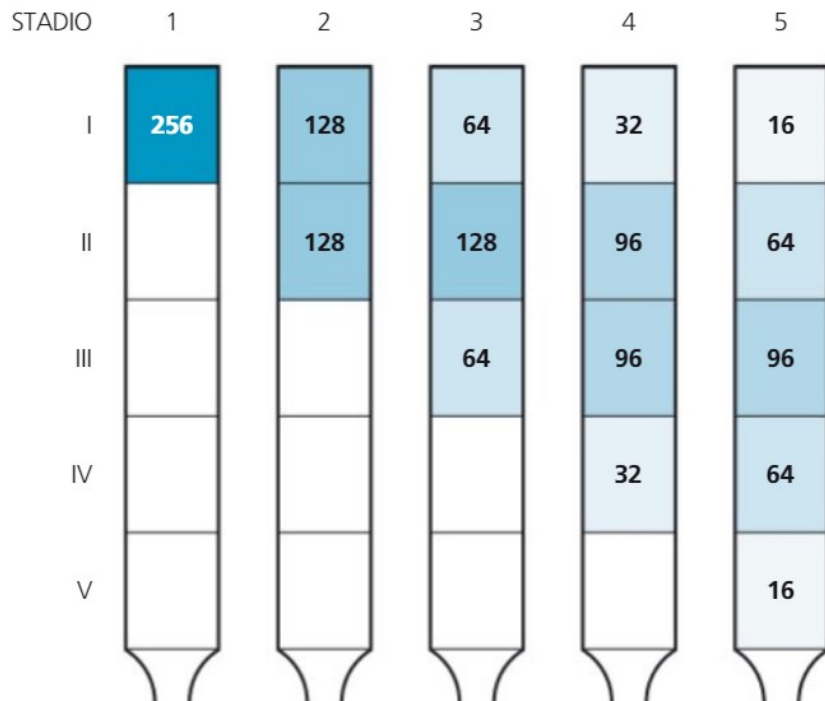
Dal valore di K_d dipende il tempo di ritenzione, cioè il tempo impiegato dalla sostanza a percorrere l'intera fase stazionaria. Infatti il tempo che una sostanza trascorre nella colonna dipende dal valore di C_s rispetto a C_m .

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 trattenute.

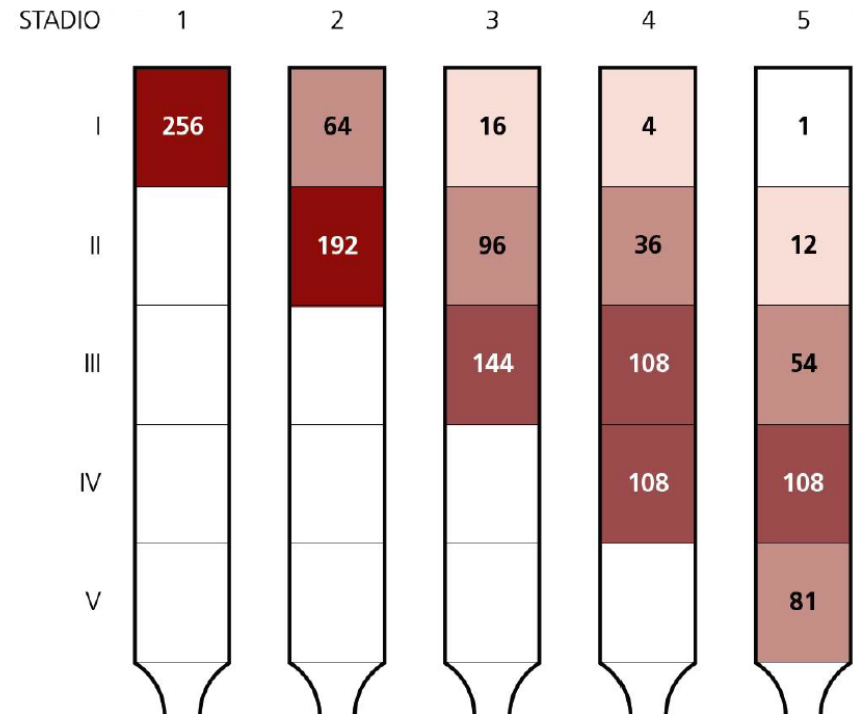
Principio di funzionamento della cromatografia per due sostanze con Kd diverso

Prendiamo una colonna cromatografica contenente una generica fase stazionaria e dividiamola immaginariamente in volumi uguali (rettangoli da I a V nella figura).



K_d=1

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

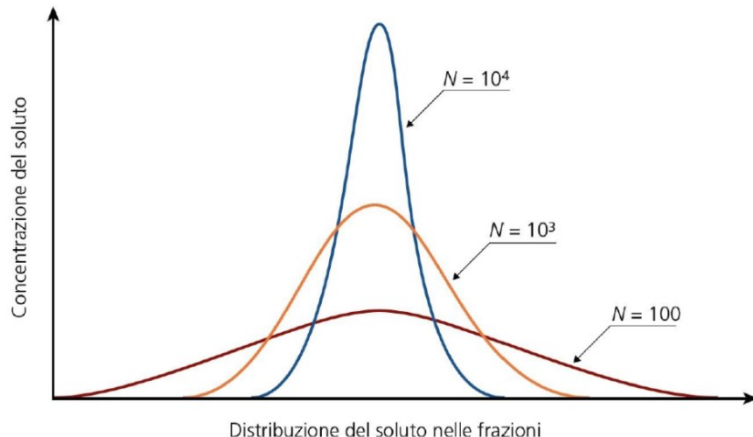


K_d=1/3

Distribuzione delle molecole all'interno della colonna di tipo gaussiano. Campione esce dalla colonna con distribuzione gaussiana

PIATTI TEORICI

Per descrivere il processo cromatografico è utilizzata una similitudine derivante dalla teoria della distillazione. Il sistema cromatografico è immaginato simile ad una colonna di distillazione, cioè composta da una serie di strati sottili chiamati piatti teorici. Un piatto teorico è il più piccolo volume all'interno della colonna in cui il soluto raggiunge un equilibrio tra fase mobile e stazionaria, ossia in cui s'instaura l'equilibrio di ripartizione. Lo spostamento del soluto lungo la colonna è dovuto all'azione dinamica della fase mobile. (N = numero di piatti teorici e quindi di equilibramenti). Nell'esempio riportato nella pagina precedente la colonna è formata da 5 piatti teorici.



$N \gg$

Aumenta l'efficienza

EFFICIENZA DELLA SEPARAZIONE CROMATOGRAFICA (PARAMETRO N)

- Si quantifica con il cosiddetto numero di **piatti teorici (N)**. Un piatto teorico è il più piccolo volume all'interno della colonna in cui il soluto raggiunge un equilibrio tra fase mobile e stazionaria, ossia in cui si instaura l'equilibrio di ripartizione;
- Il numero di piatti teorici definisce il numero di equilibramenti che avvengono in una colonna;
- Il numero di piatti teorici condiziona la larghezza del picco di eluizione, ossia l'efficienza della colonna. Più stretti sono i picchi, più efficiente è la colonna.

L'efficienza è definita come: **$N = L / H$**

Dove L è la lunghezza della colonna e H è l'altezza del piatto teorico. Migliore una colonna, minore è l'altezza del piatto teorico.

Dalla forma di un picco si può ricavare il numero di piatti teorici N per una colonna cromatografica: **$N = 16 (T_R/W)^2$**

T_R = tempo di ritenzione; W = ampiezza del picco alla base

CLASSIFICAZIONE DELLE 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 specifici
- legami ionici
- Interazioni steriche

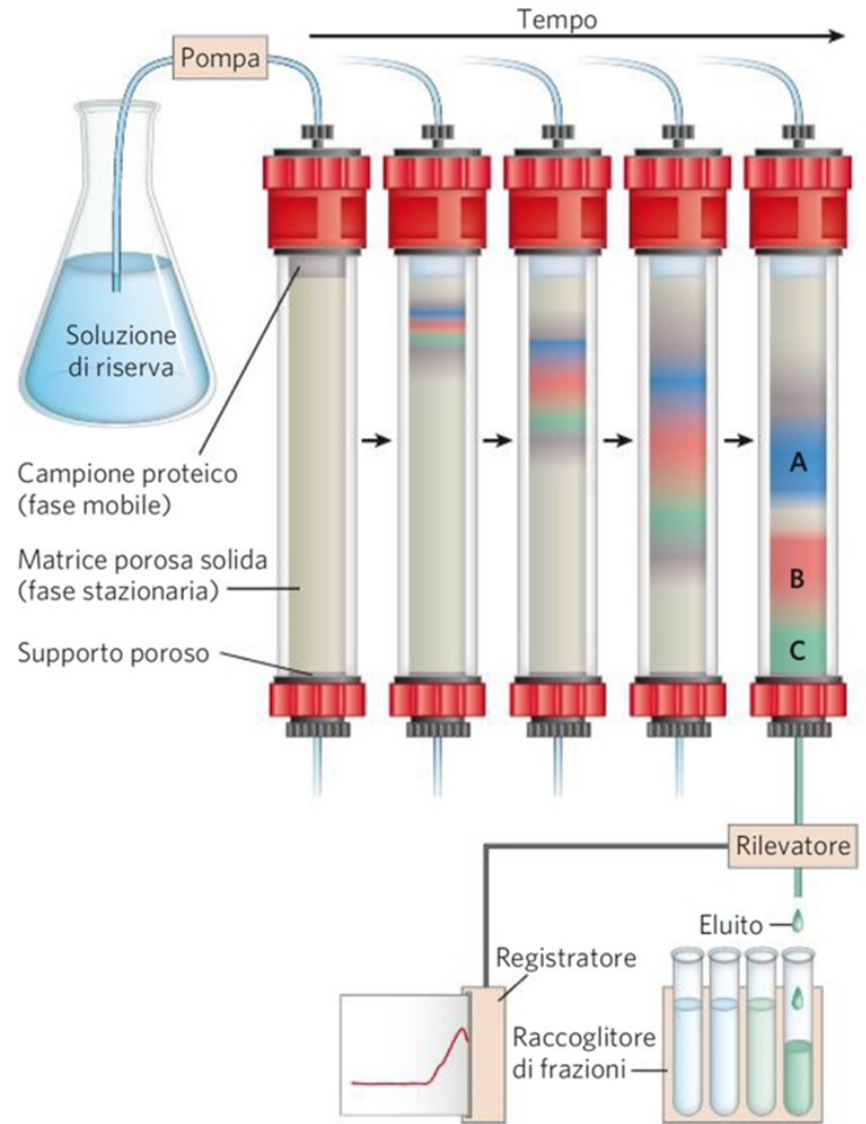
In tutte queste interazioni svolge un ruolo solitamente decisivo la polarità delle due fasi. Spesso possono essere presenti più tipi di interazione nello stesso processo cromatografico.

BASI DEL PROCEDIMENTO CROMATOGRAFICO

- il campione è introdotto nella fase mobile, che può essere un gas, un liquido o un fluido supercritico (*stato della materia in cui la sostanza ha caratteristiche chimico-fisiche intermedie fra un gas e un liquido*)
- 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 (coefficiente di ripartizione $K_d = C_s / C_m$)

CROMATOGRAFIA SU COLONNA

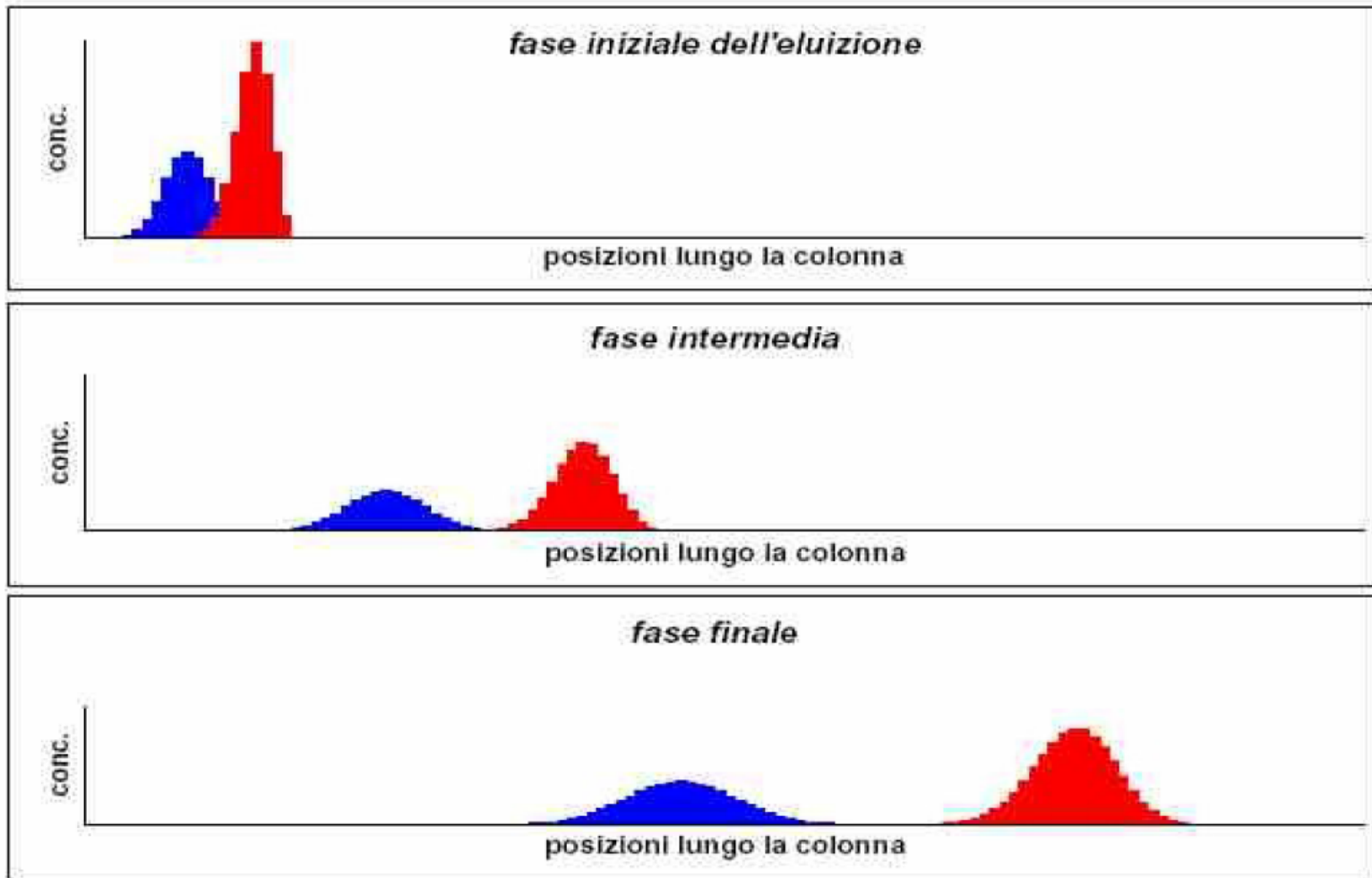
Metodo molto utilizzato per la separazione delle proteine.
Sfrutta differenze di carica, grandezza, affinità di legame per una specifica molecola (chiamata ligando)



Cromatografia su colonna

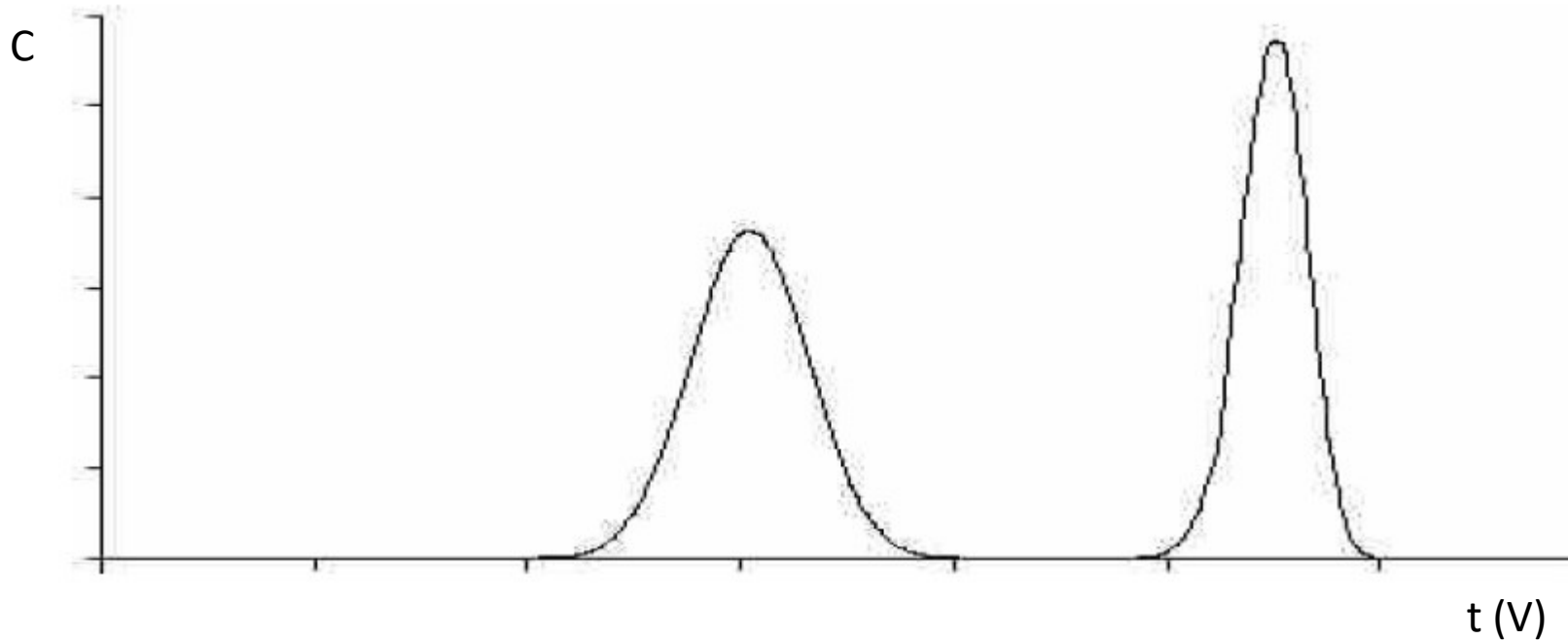
- un materiale solido e poroso (matrice) con cui viene riempita la colonna = **fase stazionaria**
- una soluzione, **la fase mobile** (eluente), che fluisce attraverso la matrice
- La soluzione che esce dal fondo della colonna (eluato) viene costantemente rimpiazzata da una soluzione contenuta in un recipiente di riserva posto in cima alla colonna.
- La soluzione di proteine da separare viene stratificata sulla parte alta della colonna e la si lascia penetrare nella matrice.
- Si aggiunge altra soluzione.
- La soluzione proteica forma una banda all'interno della fase mobile, il cui spessore iniziale dipende dal volume della soluzione proteica caricata. Man mano che le proteine migrano attraverso la colonna vengono rallentate in modo diverso, a seconda del grado di interazione con la matrice.
- La banda proteica complessiva tende quindi ad allargarsi, man mano che si muove lungo la colonna. Le varie proteine (come la A, la B e la C, mostrate in blu, rosso e verde) gradualmente si separano l'una dall'altra, formando bande separate all'interno della banda più ampia che comprende l'intera gamma delle proteine. Le singole bande si allargano con il tempo, per effetto della diffusione delle molecole, un processo che diminuisce la risoluzione. In questo esempio, la proteina A è ben separata dalle proteine B e C, ma la diffusione impedisce la completa separazione di B e C in queste condizioni. Quindi la proteina C viene rilevata man mano che esce dalla colonna (eluizione) e la sua presenza viene registrata

CROMATOGRAFIA SU COLONNA



Con il procedere della separazione, le sostanze usciranno dalla colonna dopo il passaggio di un certo tempo (***tempo di ritenzione***) durante il quale è fluìto un certo volume di solvente (***volume di ritenzione***). Ogni sostanza eluisce come un picco di concentrazione di forma gaussiana

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



ELUIZIONE: separazione di sostanze diverse tramite il passaggio della fase mobile attraverso la fase stazionaria in una cromatografia

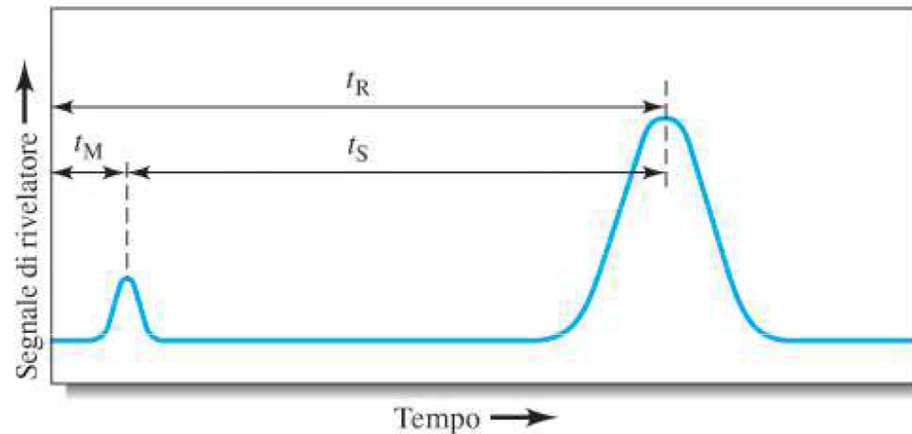
I **principali parametri cromatografici** sono quattro:

- tempo di ritenzione
- tempo morto
- tempo netto di ritenzione
- larghezza dei picchi

Il volume di fase mobile richiesto per eluire una molecola viene definito **volume di eluizione** (V_e) o di ritenzione.

TEMPO DI RITENZIONE, MORTO, NETTO DI RITENZIONE

Il tempo di ritenzione t_R è il tempo che impiega un componente della miscela caricata in colonna ad uscire dalla colonna stessa o, tecnicamente, ad essere rivelato come picco dal detector. Corrisponde all'apice del picco.



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 (o volume morto, V_0)
- il picco a destra rappresenta un soluto che ha, invece, interazione con la fase stazionaria ed esce al tempo $t_R > t_M$
- la differenza tra il tempo di ritenzione (t_R) e il tempo morto (t_M) rappresenta il tempo in cui l'analita viene trattenuto sulla fase stazionaria (t_S). Questa differenza è indicata come tempo netto di ritenzione t_s (o t'_R) ed è espressa dalla formula: $t_s = t_R - t_M$

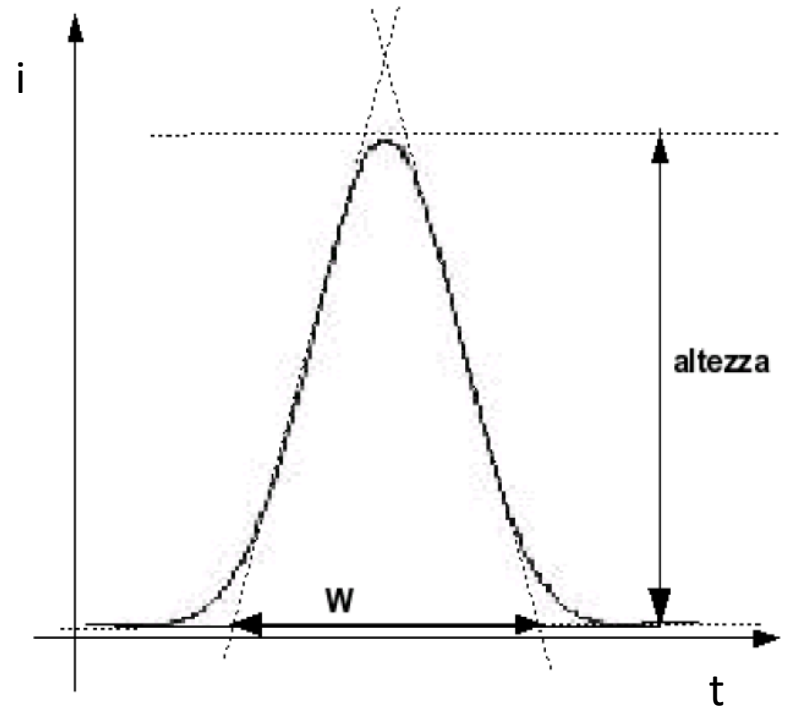
I picchi e il cromatogramma

Ogni sostanza in uscita dalla colonna genera un segnale che verrà registrato sotto forma di **picco**.

Ogni picco è caratterizzato da:

-Altezza del picco. È la distanza fra il massimo del picco e la sua base, misurata perpendicolarmente all'asse dei tempi.

-Ampiezza del picco. È il segmento delimitato sulla base del picco dai punti di intersezione delle tangenti tracciate nei punti di flesso di ambedue i lati.



La successione dei vari picchi, corrispondenti alle varie sostanze in uscita dalla colonna, costituisce il **cromatogramma**. In ordinate è riportata la risposta del rivelatore e in ascisse i tempi di uscita delle varie sostanze.

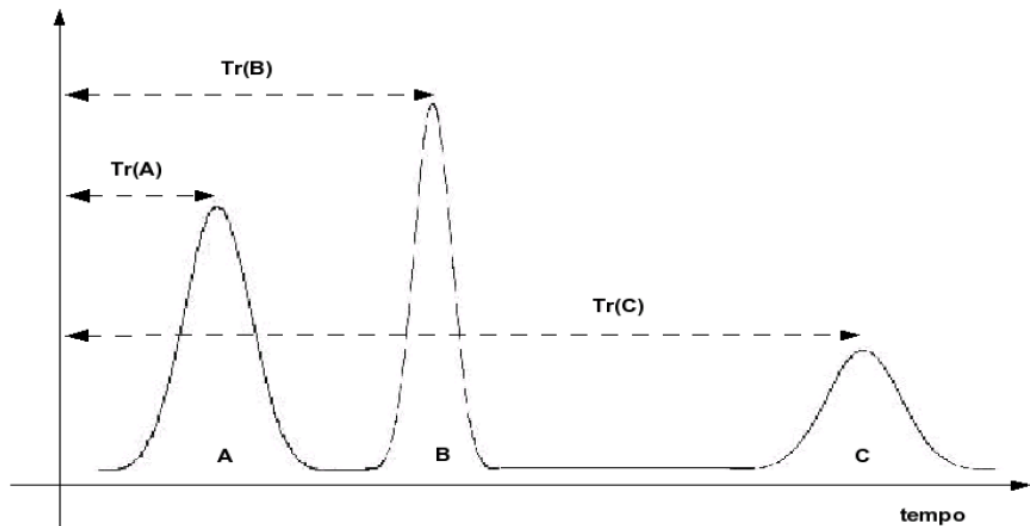
A questo punto, dal grafico (oltre ad altezza e ampiezza dei picchi) si determinano due parametri essenziali:

tempo di ritenzione = tempo che intercorre tra il caricamento del campione e la registrazione del massimo del picco;

- dipende dalla natura della sostanza, dalla colonna e dalle condizioni operative;
- è fondamentale per le analisi qualitative.

area del picco

- è la superficie delimitata dal contorno del picco e la linea di base;
- dipende dalla quantità di sostanza in uscita e dalle caratteristiche del rivelatore;
- è fondamentale
per le analisi quantitative



SELETTIVITÀ, EFFICIENZA E CAPACITÀ

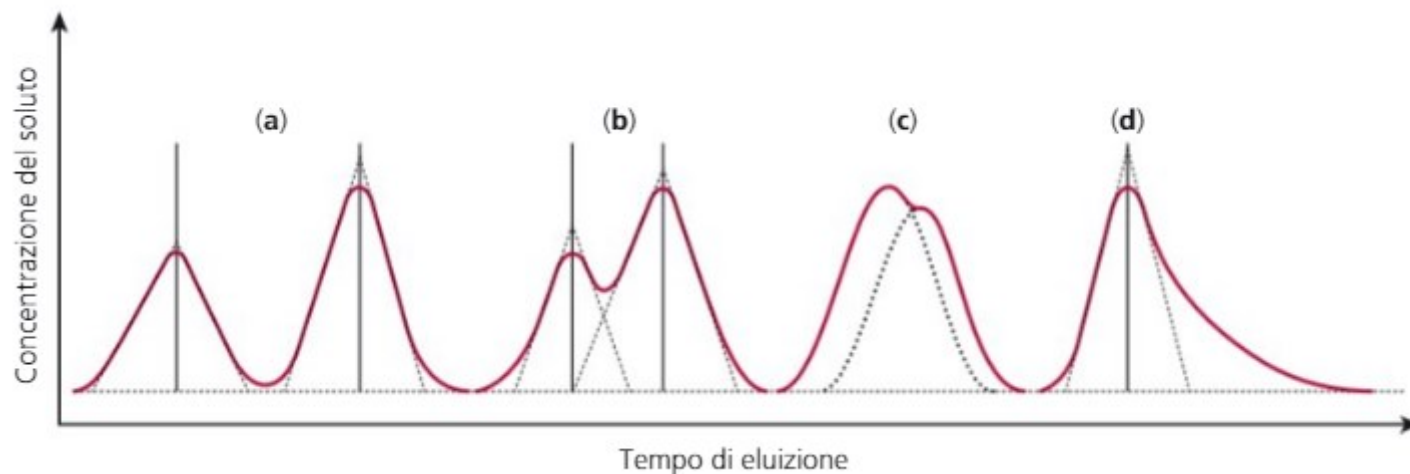


Il buon esito di ogni procedura cromatografica si valuta mediante la capacità di separare completamente (risolvere) un composto da una miscela di altri composti. La risoluzione dei picchi dipende dalla loro larghezza e dalla loro vicinanza.

Selettività: capacità di un sistema cromatografico di discriminare tra due composti. Dipende dai tempi di ritenzione degli analiti. È legata alle interazioni chimiche che si hanno tra gli analiti e la fase stazionaria/fase mobile.

Efficienza: È legata all'ampiezza dei picchi e dipende essenzialmente da fattori cinetici (velocità flusso, impaccamento, diffusione), che influiscono sull'altezza equivalente del piatto teorico (HETP) e sul numero di piatti teorici (N).

Capacità: misura della quantità di composto che può essere risolto senza sovrapposizione dei picchi.

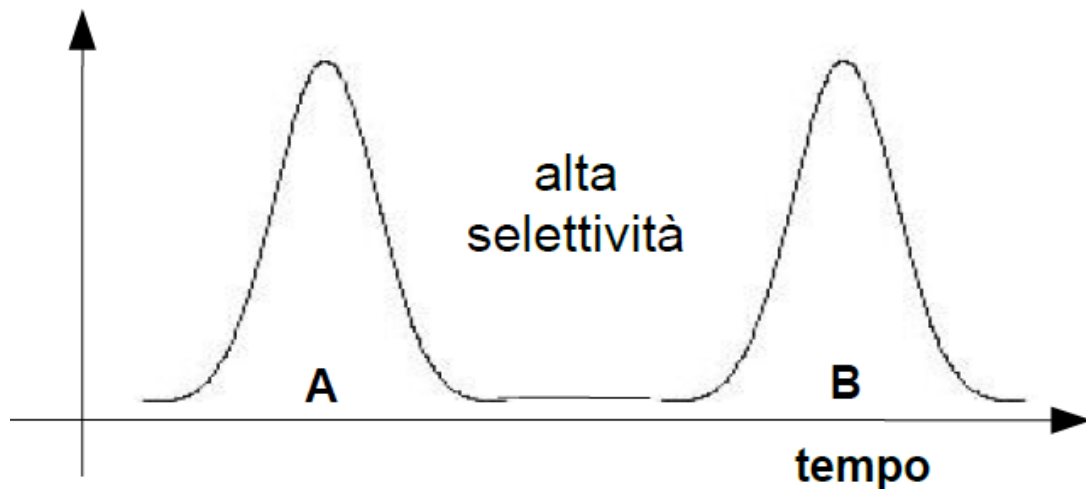
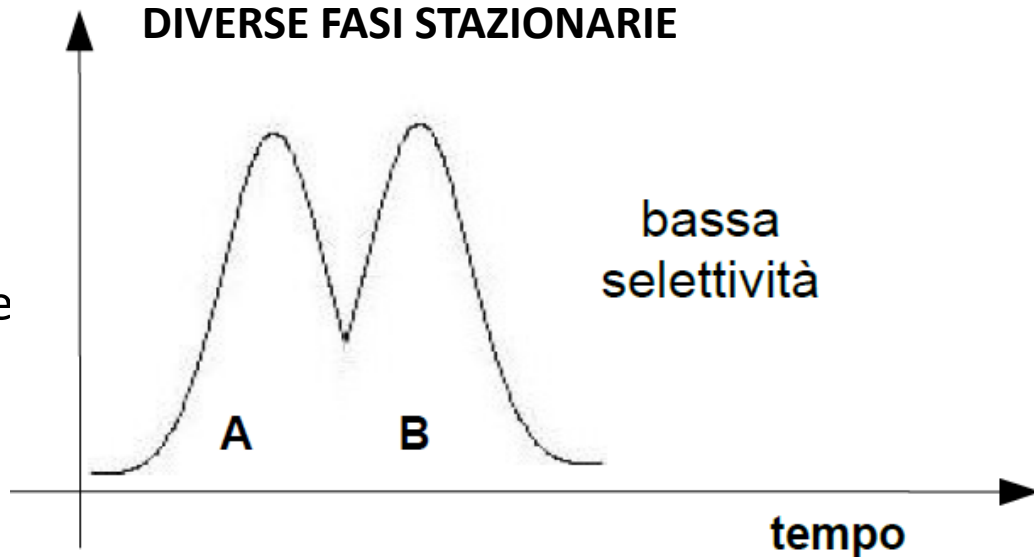


Risoluzione dei picchi di eluizione di una colonna cromatografica. La figura mostra: (a) la separazione completa di due molecole; picchi; (b) una separazione incompleta con sovrapposizione dei due picchi; (c) la separazione è talmente scarsa che il picco mostra una gobba, dovuta alla sovrapposizione quasi completa dei due picchi; (d) il picco di eluizione asimmetrico dovuto al fenomeno dello “scodamento” (diffusione della molecola durante la cromatografia)

SELETTIVITÀ

La capacità di una colonna di fornire picchi distanziati; è legata alle interazioni chimiche che si hanno tra gli analiti e la fase stazionaria/fase mobile.

SEPARAZIONE DI DUE COMPOSTI SU DUE DIVERSE FASI STAZIONARIE



EFFICIENZA

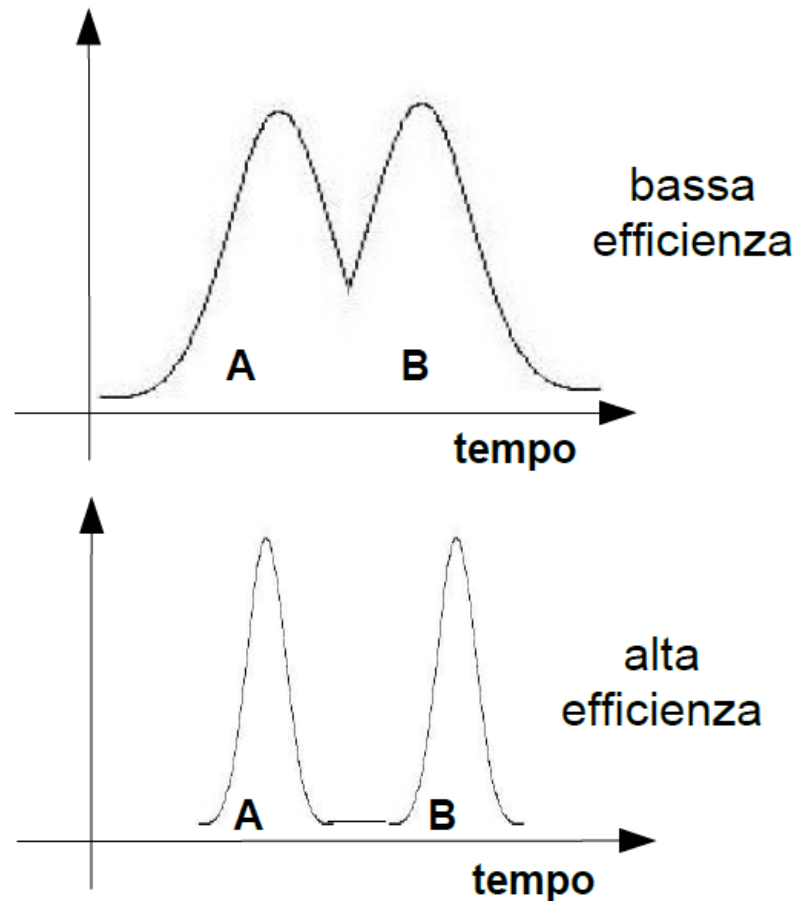
Capacità del sistema cromatografico di mantenere compatta la banda di eluizione di una sostanza lungo tutto il percorso della fase mobile.

MOLTO IMPORTANTE: ottenere picchi alti e stretti all'uscita della colonna.

Se due sostanze hanno tempi di ritenzione molto vicini potrebbero essere ugualmente separate.

Quindi, quanto più stretti sono i picchi tanto più efficiente risulta la colonna.

A fianco sono riportati due cromatogrammi di una miscela di due sostanze ottenuti con colonne diverse; in ambedue i casi si ha la stessa selettività, ma nel secondo caso si ha una maggior efficienza.



RISOLUZIONE

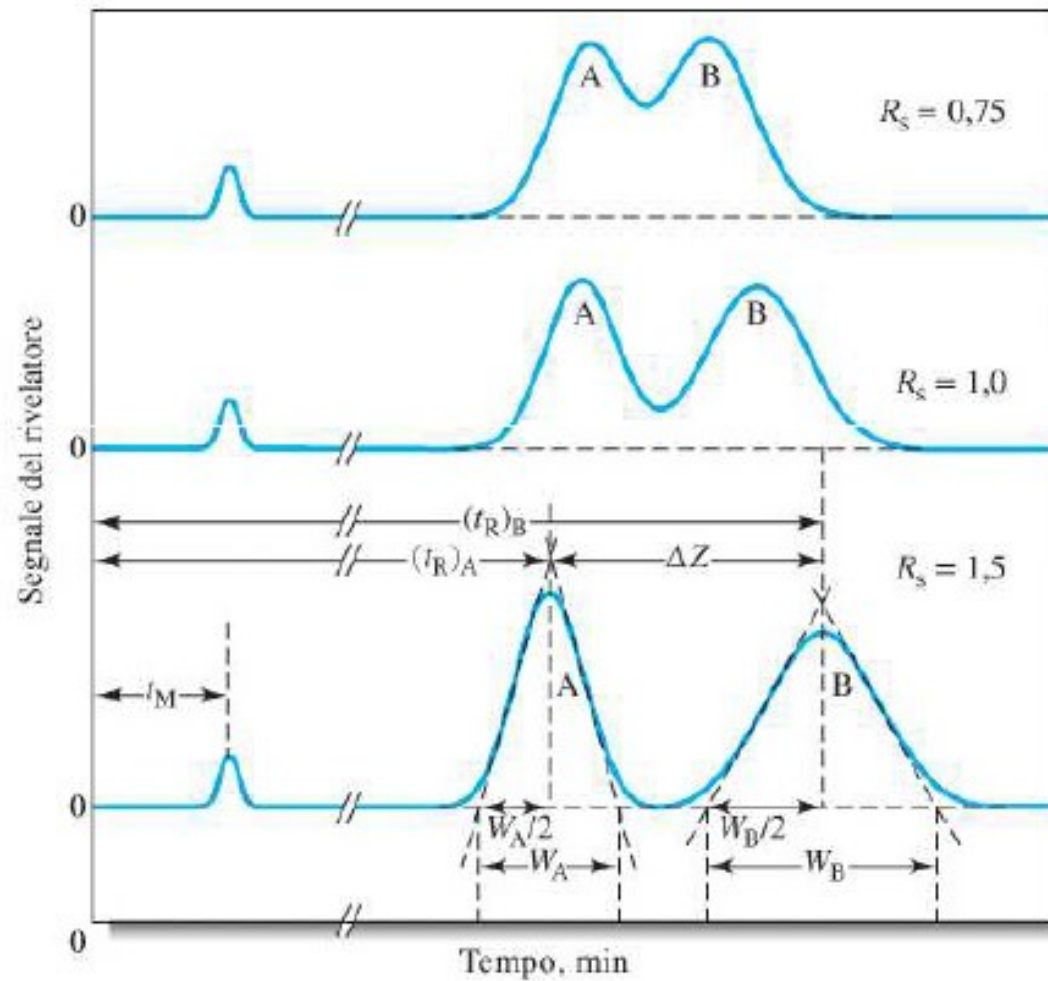
Questo fattore tiene conto sia della selettività che dell'efficienza, e indica il grado di effettiva separazione ottenuto per due sostanze in un processo cromatografico.

Dal punto di vista numerico si ottiene dalla relazione:

$$R = \frac{Tr(B) - Tr(A)}{W_A/2 + W_B/2}$$

Per avere una buona separazione, dal punto di vista quantitativo, si deve avere una risoluzione di almeno 0,8. Per avere una separazione a livello della linea di base $R = 1,5$.

RISOLUZIONE

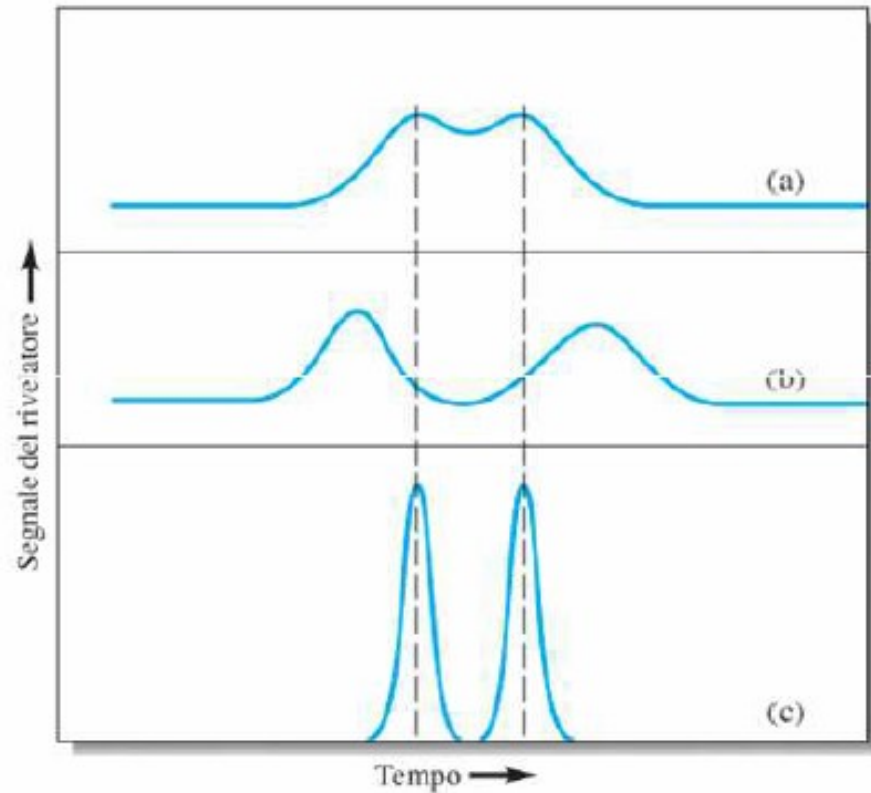


SEPARAZIONE OTTIMALE

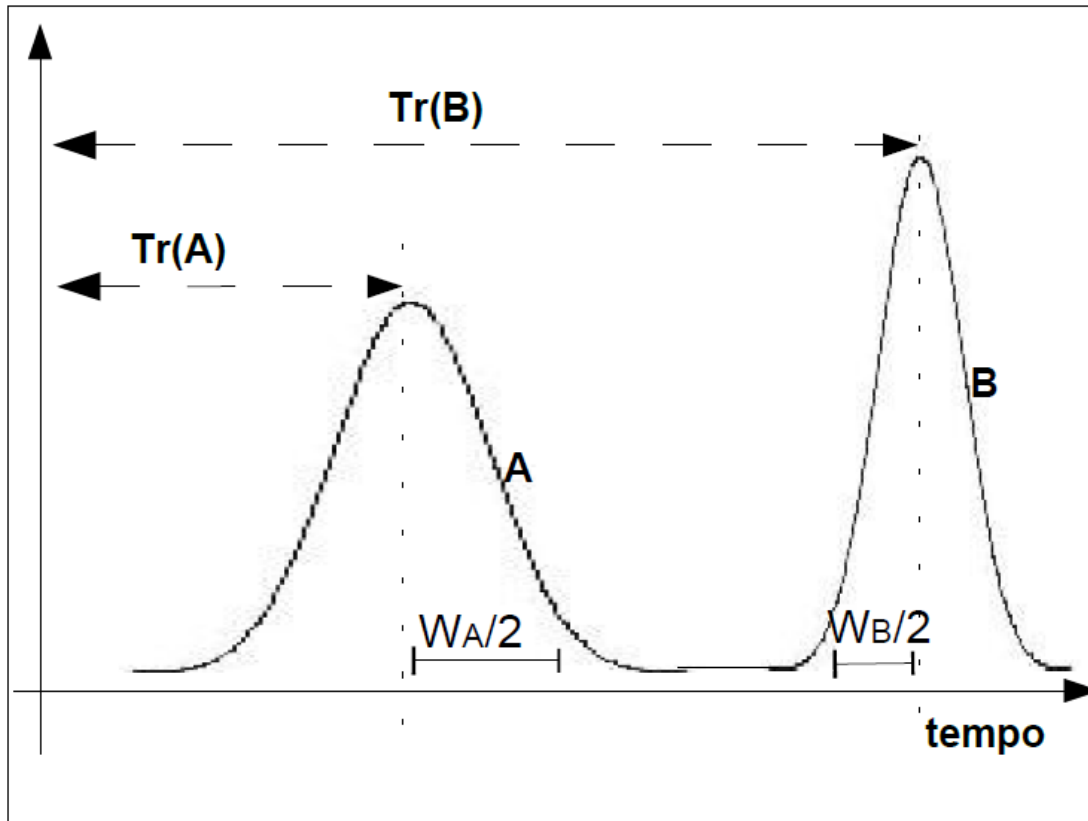
a) separazione con scarsa risoluzione e basso N

b) migliora la risoluzione ma N è sempre basso

c) ottima risoluzione e buono N



ESEMPIO DI SEPARAZIONE



Esempio 1

- picchi ben separati-

$$Tr(A)=39$$

$$Tr(B)=93$$

$$W_A/2=15$$

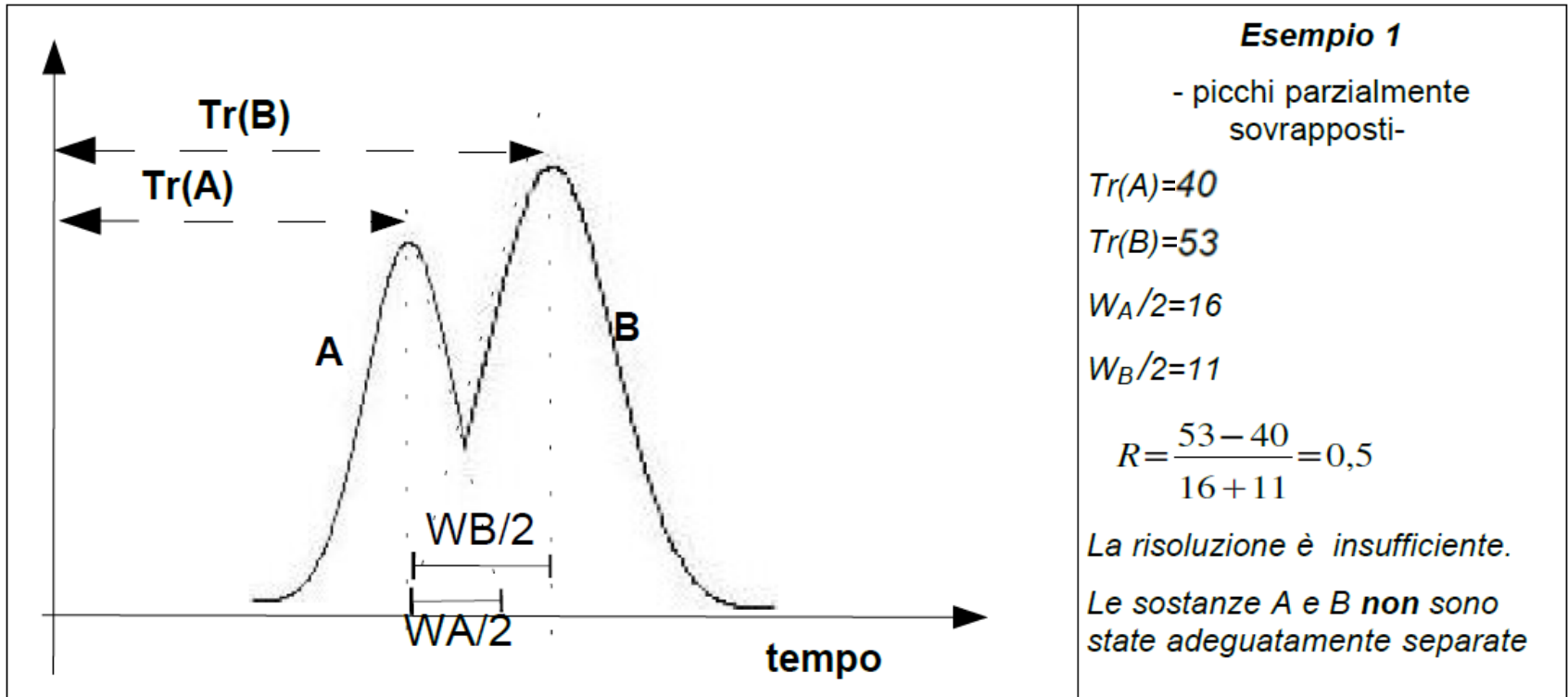
$$W_B/2=8$$

$$R = \frac{93 - 39}{15 + 8} = 2,3$$

La risoluzione è buona.

Le sostanze A e B sono state adeguatamente separate

ESEMPIO DI SEPARAZIONE



Separazione di una stessa miscela proteica su due colonne diverse

Columns: Superose 6 Increase 10/300 GL and Superdex 200 Increase 10/300 GL
Sample: 1. IgM ($M_r \sim 970\,000$)*, 0.5 mg/ml
2. Thyroglobulin ($M_r\,669\,000$), 1 mg/ml
3. Ferritin ($M_r\,440\,000$), 0.1 mg/ml
4. Bovine serum albumin (BSA, $M_r\,66\,000$), 1 mg/ml
5. Myoglobin ($M_r\,17\,000$), 0.5 mg/ml
6. Vitamin B₁₂ ($M_r\,1355$), 0.05 mg/ml
Sample volume: 100 μ l
Flow rate: 0.5 ml/min
Buffer: PBS, (10 mM phosphate buffer, 140 mM sodium chloride, pH 7.4)
System: ÄKTAmicro

* In addition, this sample also contained aggregated forms of IgM.

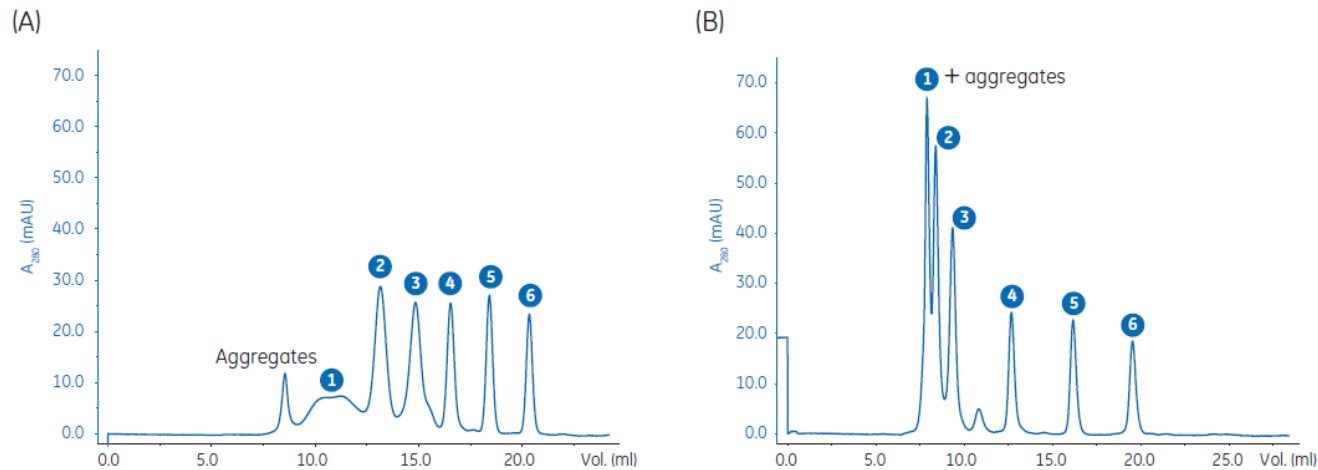
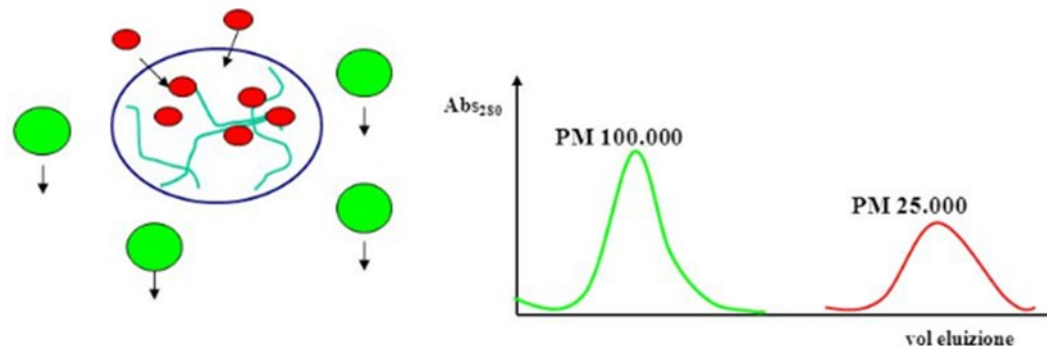


Fig 1.7. Chromatograms showing high-resolution SEC of six standard proteins on (A) Superose 6 Increase 10/300 GL and (B) Superdex 200 Increase 10/300 GL.

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 analita tra il solvente interno alla particella di gel e quello esterno è definito dal

Coefficiente di distribuzione K_d , funzione della massa molecolare

$K_d = 0$ l'analita è grande e completamente escluso dal solvente interno al gel

$K_d = 1$ l'analita è permeabile alle particelle di gel

$0 < K_d < 1$ variabilità nella porosità delle particelle e di conseguenza 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_0 , o Volume vuoto, o Volume morto
2. Il coefficiente di distribuzione K_d
3. Il volume interno alle particelle di gel V_i

$$V_e = V_0 + K_d V_i$$

$V_i = a \cdot W_r$ 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

Regola generale: volume del campione 1-5% del volume totale della colonna.

$$\text{Volume totale } (V_T) = V_0 + V_i + V \text{ matrice}$$

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

Gel	Particle Size Range, Hydrated Beads (μM)	Typical Hydrated Bed Volume, ml/g of Dry Gel	Typical Flow Rates (cm/hr)*	Typical Fractionation Range/Nominal Exclusion Limit (Daltons)**[†]
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 resine Superdex sono costituite da una matrice composta di destrano e agarosio

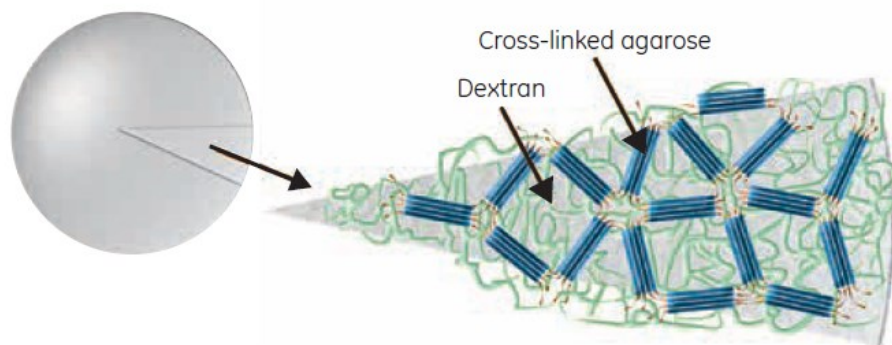


Fig 2.1. A schematic section of a Superdex particle. In Superdex, the dextran chains are covalently linked to a highly cross-linked agarose matrix.

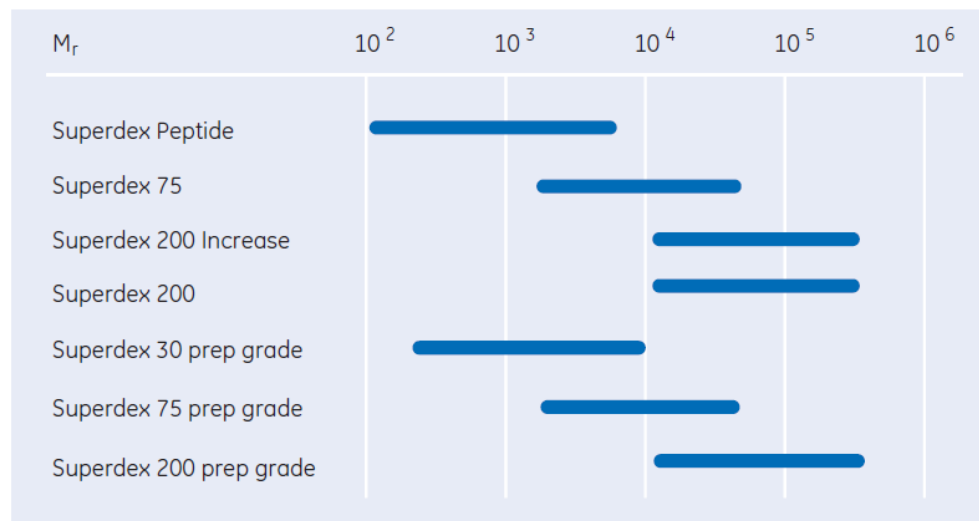


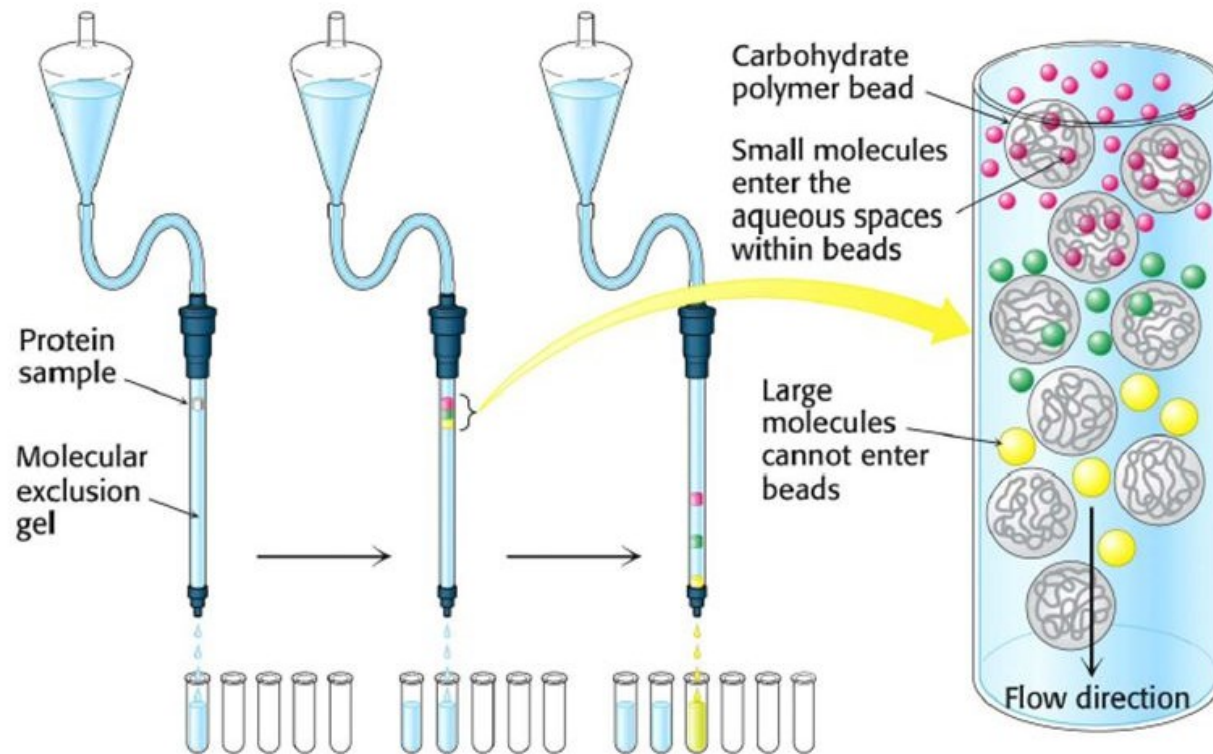
Fig 2.2. Fractionation ranges for Superdex.

CROMATOGRAFIA DI ESCLUSIONE DIMENSIONALE

Tipi di colonne



CROMATOGRAFIA DI ESCLUSIONE DIMENSIONALE



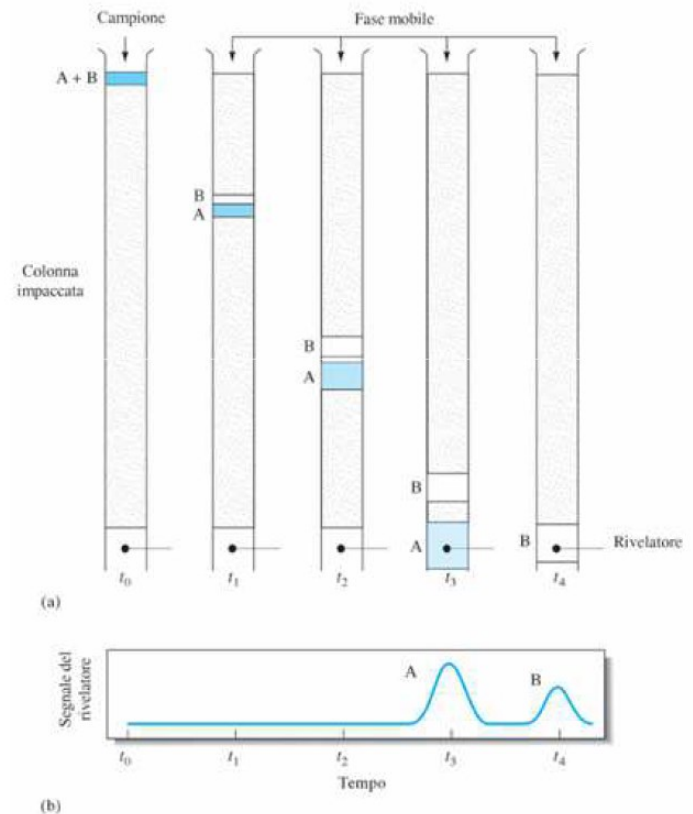
Le molecole grandi non entrano nei pori e passano attraverso la Fase S senza essere trattenute; molecole molto piccole trascorrono molto tempo nella Fase S. Solo entro una dimensione critica esiste una relazione tra tempo di permanenza e dimensione molecolare, che può essere utilizzata per separazione.

VISUALIZZAZIONE DELLA SEPARAZIONE

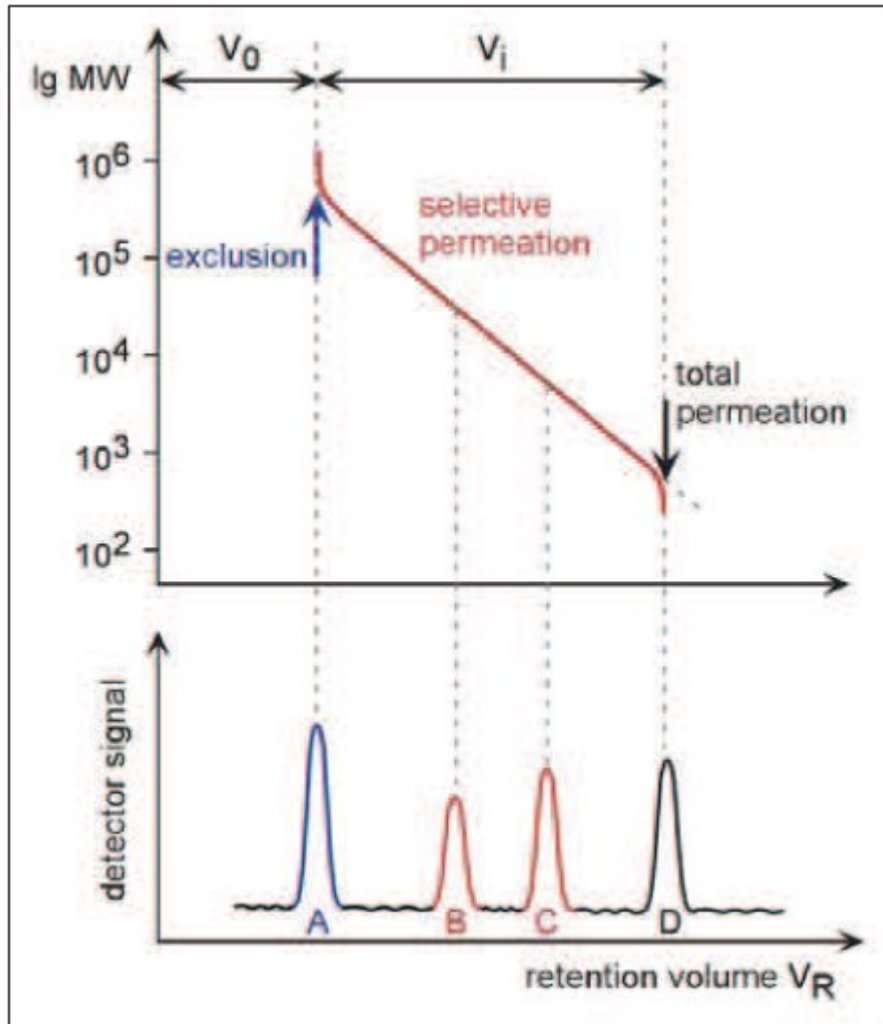
Ponendo all'uscita della colonna un rivelatore che misuri la concentrazione del soluto nell'eluato (cioè la fase mobile che esce dalla colonna) e riportando il segnale in funzione del tempo si può ottenere un cromatogramma.

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.



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

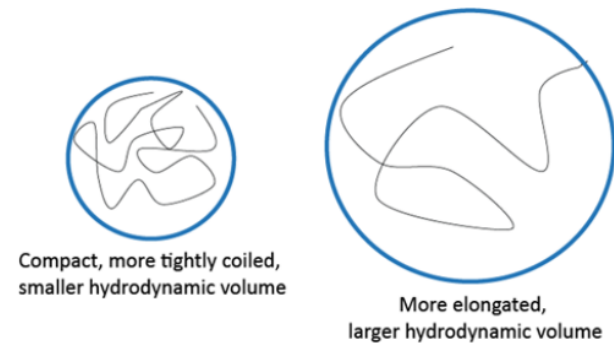


Figure 11.7: Representation of hydrodynamic volume

Source: Lauren Zarzar

volume idrodinamico o raggio idrodinamico è influenzato da vari fattori: polimero (chimica e struttura), solvente, interazioni solvente/polimero, temperatura.

CROMATOGRAFIA DI ESCLUSIONE DIMENSIONALE

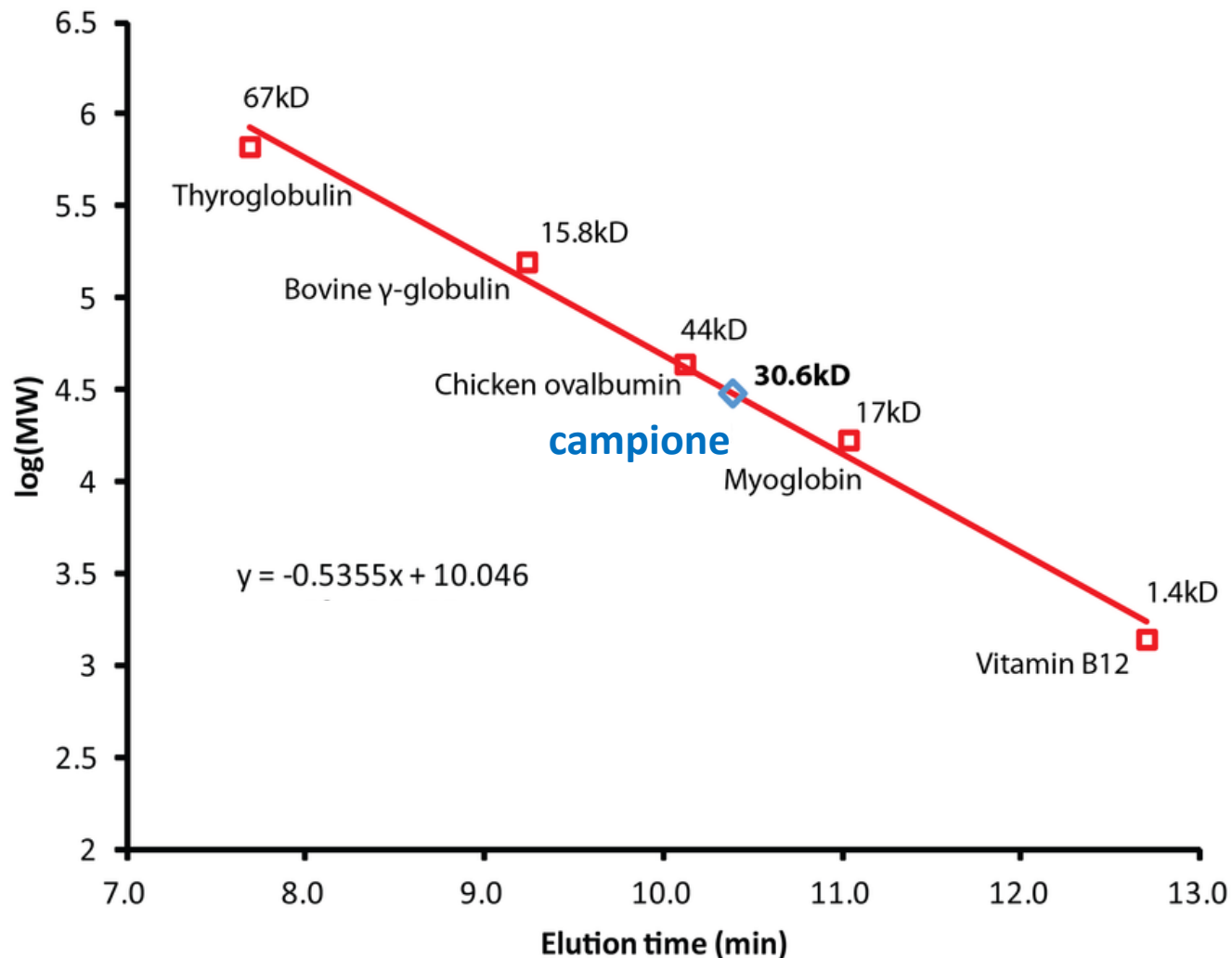


APPLICAZIONI

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 ESCLUSIONE DIMENSIONALE

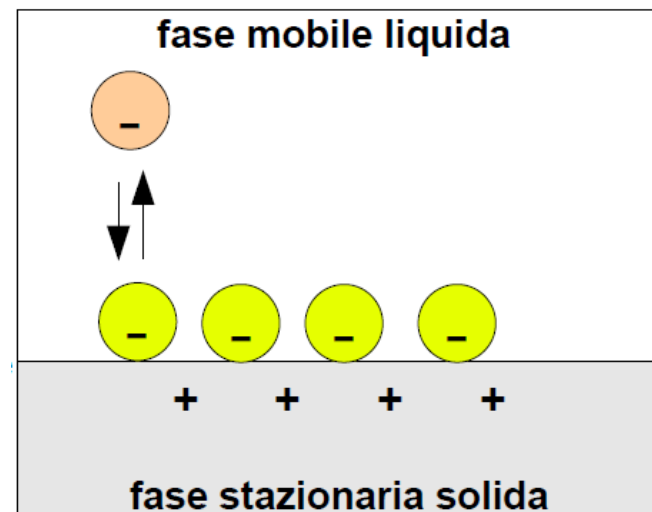
DETERMINAZIONE DELLA MM DI UNA PROTEINA



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.

Derivati della cellulosa

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

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

ALTRI TIPI DI MATRICI

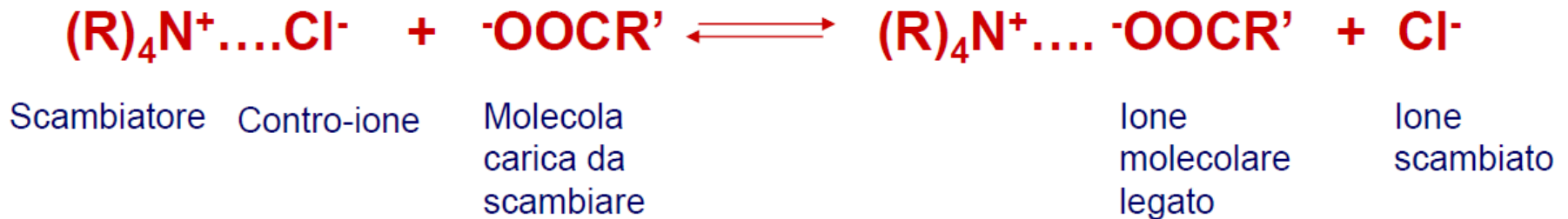
RESINA	SUPPORTO	GRUPPO FUNZIONALE	TIPO
DEAE Sepharose (Pharmacia) DEAE Bio-Gel A (Bio-Rad)	Agarosio	$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+\text{H}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$ dietilamminoetil (DEAE)	Scambio anionico (debole)
QAE Sephadex C50 (Pharmacia)	Destrano	Dietil-(2-idrossipropil) amminoetil (un ammina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

EQUILIBRI DI SCAMBIO IONICO

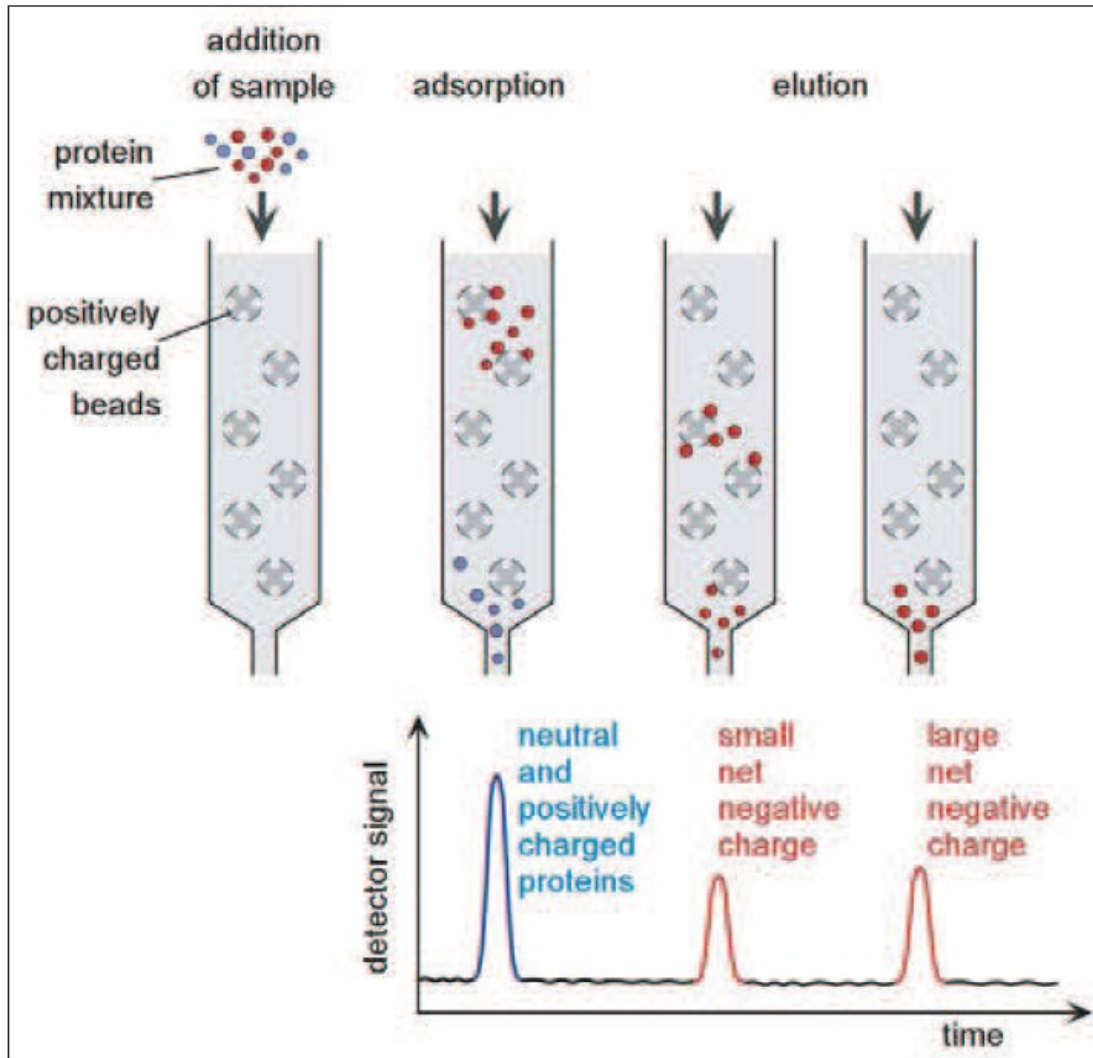
Scambiatore cationico



Scambiatore anionico

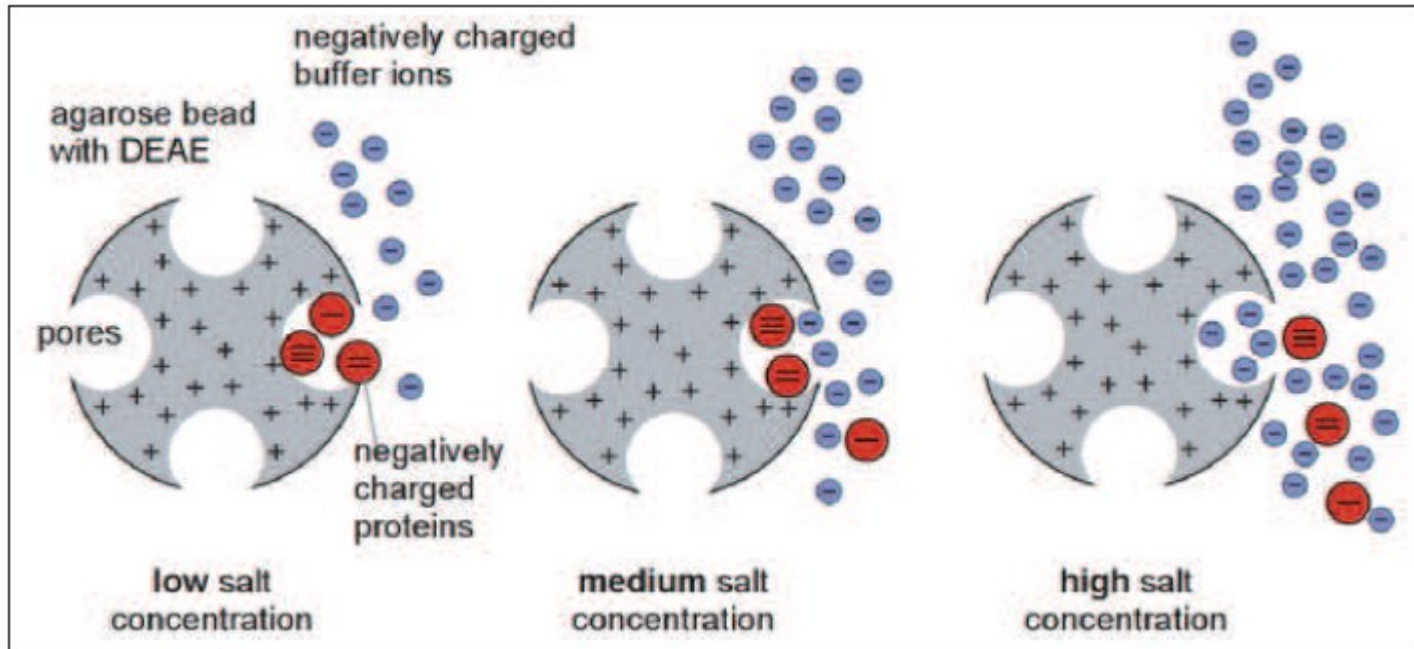


CROMATOGRAFIA A SCAMBIO IONICO



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

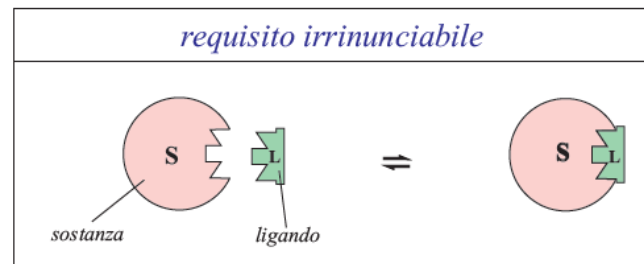
Separazione di amminoacidi

Separazione di proteine

Separazione di acidi nucleici

CROMATOGRAFIA DI AFFINITÀ

A differenza degli altri tipi di cromatografia, dell'elettroforesi e della centrifugazione, non si basa sulle differenze nelle proprietà chimico-fisiche delle molecole da separare, ma **sfrutta le interazioni altamente specifiche che si possono instaurare tra molecole biologiche.**



In teoria si può raggiungere una purificazione completa in una singola tappa, anche partendo da miscele complesse.

Questa tecnica prevede che la molecola da purificare si leghi reversibilmente a un ligando specifico, immobilizzato su una matrice insolubile. L'introduzione in una colonna di affinità di una miscela, anche complessa, porterà al legame selettivo della molecola da purificare con la fase stazionaria, mentre gli altri componenti sono rimossi con un lavaggio. La molecola di interesse viene recuperata eluendo la colonna con un tampone opportuno.

CROMATOGRAFIA DI AFFINITÀ

Requisito: conoscere la struttura e le proprietà di legame della molecola che si vuole isolare, per utilizzare il giusto **ligando** e scegliere (o sintetizzare) una buona resina d'affinità. Sono disponibili in commercio numerose resine per cromatografia di affinità, ma si può preparare in laboratorio la propria resina, immobilizzando su una matrice il ligando che abbiamo scelto per la purificazione della molecola di nostro interesse.

Il ligando utilizzato è legato alla resina attraverso un braccio spaziatore (lunghezza di 6-10 atomi di carbonio) per renderlo più accessibile alla molecola di interesse

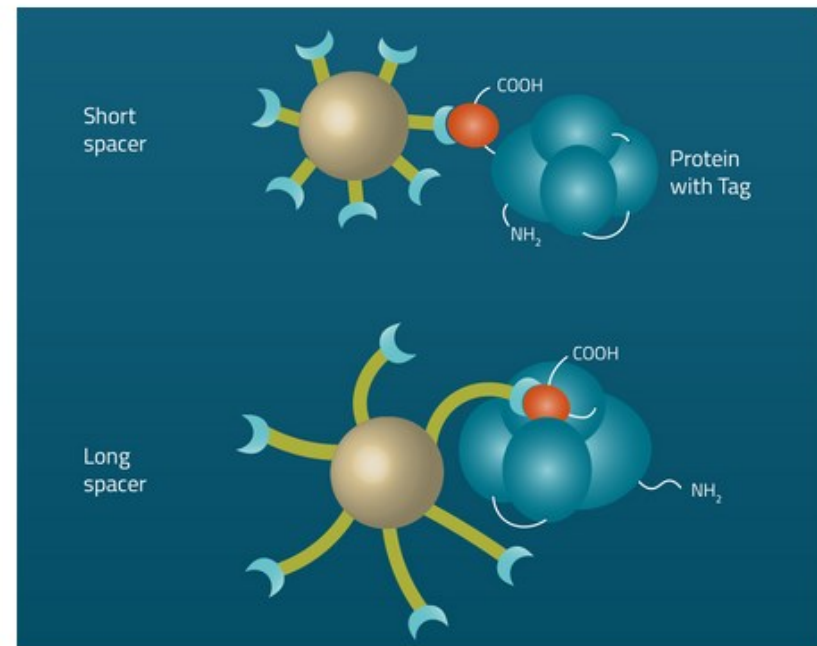


Fig. 2: A functionalized bead

CROMATOGRAFIA DI AFFINITÀ



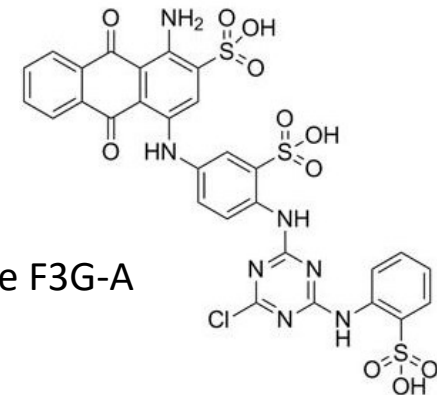
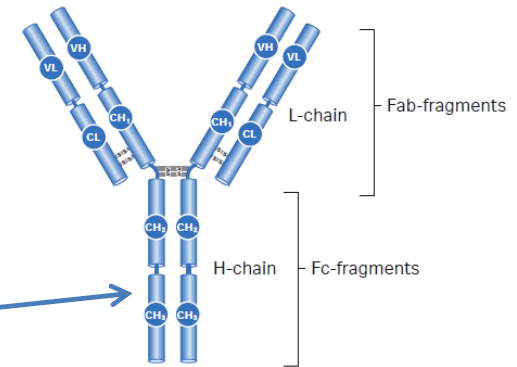
È possibile scegliere un ligando che abbia:

- una **specificità assoluta di legame** per una singola proteina, ad es: un anticorpo, un inibitore di un enzima, un ligando di un recettore
- una **selettività per un determinato gruppo chimico**.

CROMATOGRAFIA DI AFFINITÀ

Ligandi gruppo-specifici:

- nucleotidi: specifici per le proteine che legano i nucleotidi
- avidina: specifica per la biotina
- Eparina: specifica per i fattori della coagulazione e per le proteine che legano il DNA
- proteine A e G: specifiche per la porzione costante Fc delle immunoglobuline IgG
- concanavalina A (lectina): specifica per il mannosio presente nelle glicoproteine)
- frammenti poli-T (specifici per gli mRNA eucariotici che contengono la coda di poli-A)
- Cibacron Blue F3G-A: specifico per l'albumina e per le proteine che legano i nucleotidi.



Cibacron Blue F3G-A

CROMATOGRAFIA DI AFFINITÀ



Procedura per la cromatografia di affinità

Simile a quella usata nelle altre cromatografie liquide.

Il tampone di equilibratura deve favorire il massimo di interazione con la molecola da purificare; in genere si usano tamponi contenenti sali (NaCl 0,25-0,5 M) per minimizzare le interazioni non specifiche tra le molecole e la matrice.

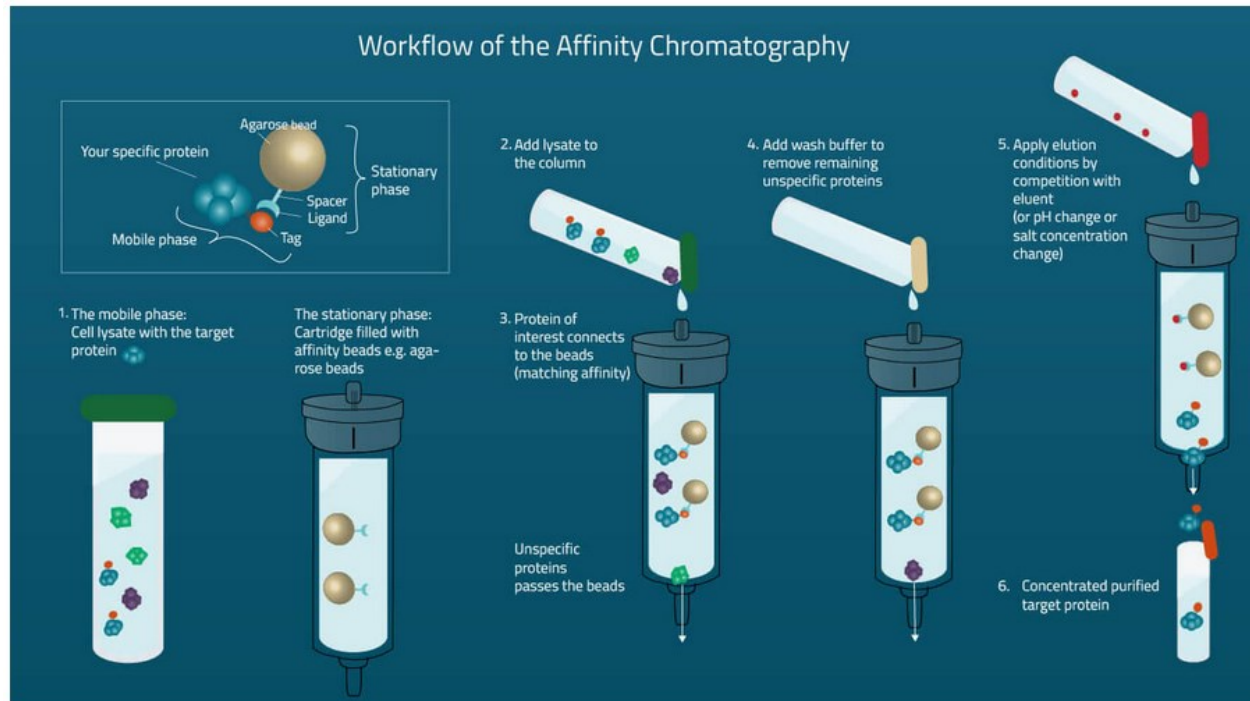
Una volta applicato il campione, la colonna viene lavata con lo stesso tampone, per allontanare i composti che non interessano

Eluizione: aspecifica o per competizione.

Eluizione aspecifica:

- variazione di pH o forza ionica, che provoca una diminuzione della forza del legame tra molecola e ligando. Solitamente si usano a questo scopo concentrazioni di NaCl fino a 1 M, oppure agenti caotropici (=classe eterogenea di composti organici che possiedono la capacità di rompere i legami idrofobici e i legami idrogeno con conseguente denaturazione), quali cloruro di guanidinio e urea, che però rischiano di provocare la denaturazione della proteina.
- modificazione della temperatura

FLUSSO DI LAVORO DI UNA CROMATOGRAFIA DI AFFINITÀ SU COLONNA



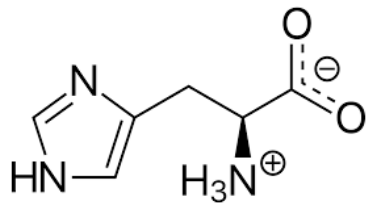
- 1: Le due fasi di una cromatografia di affinità: la fase mobile e quella stazionaria.
- 2: Primo passaggio: aggiungi il lisato cellulare alla colonna.
- 3: La proteina di interesse interagirà con le sferette di resina per affinità con il ligando
- 4: Aggiungere il tampone di lavaggio e rimuovere le proteine non specifiche e altre sostanze.
- 5: Eluire la proteina di interesse dalle sferette di affinità con un tampone di eluizione cambiando il pH o la concentrazione di sale rispetto al tampone di lavaggio.
- 6: Viene raccolta la proteina di interesse purificata e attiva!

CROMATOGRAFIA DI AFFINITÀ

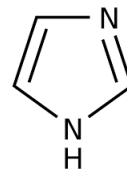
Il metodo di **eluizione per competizione** comporta l'aggiunta di un eccesso di ligando libero nel tampone di eluizione. Tuttavia, il ligando potrebbe essere molto costoso e se il legame è piuttosto forte possono essere necessarie elevate concentrazioni di ligando libero.

Il materiale così eluito contiene anche gli agenti impiegati per l'eluizione, che dovranno essere successivamente rimossi.

Un esempio di eluizione per competizione è quello che si ottiene con l'imidazolo nella cromatografia su metalli immobilizzati per purificare le proteine ricombinanti che hanno l'His-tag. In questo caso, data l'economicità dell'imidazolo, i costi sono molto contenuti e questa cromatografia è ampiamente utilizzata



istidina



imidazolo

CROMATOGRAFIA DI AFFINITÀ



SEPARAZIONE DI PROTEINE CONTRASSEGNALE DA UN TAG

La purificazione delle proteine mediante cromatografia di affinità è una tecnica potente per separare le proteine di interesse da una miscela.

Le proteine sono contrassegnate da "tag" (= etichette) che conferiscono loro proprietà di legame specifiche.

Un opportuno ligando immobilizzato alla resina si lega alla proteina marcata. Quindi la proteina di interesse è separata dal resto del campione.

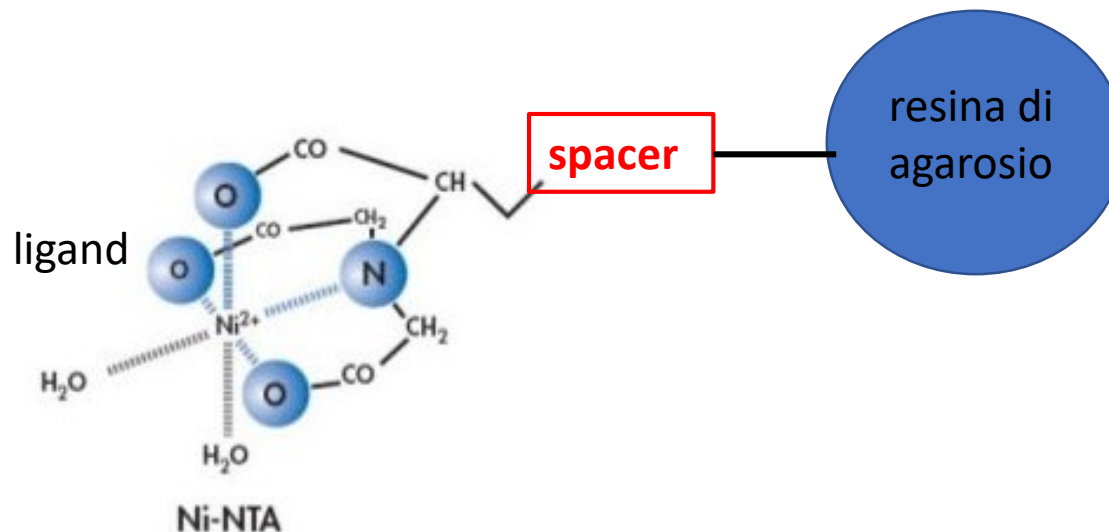
PROTEINE CON His TAG

CROMATOGRAFIA DI AFFINITÀ

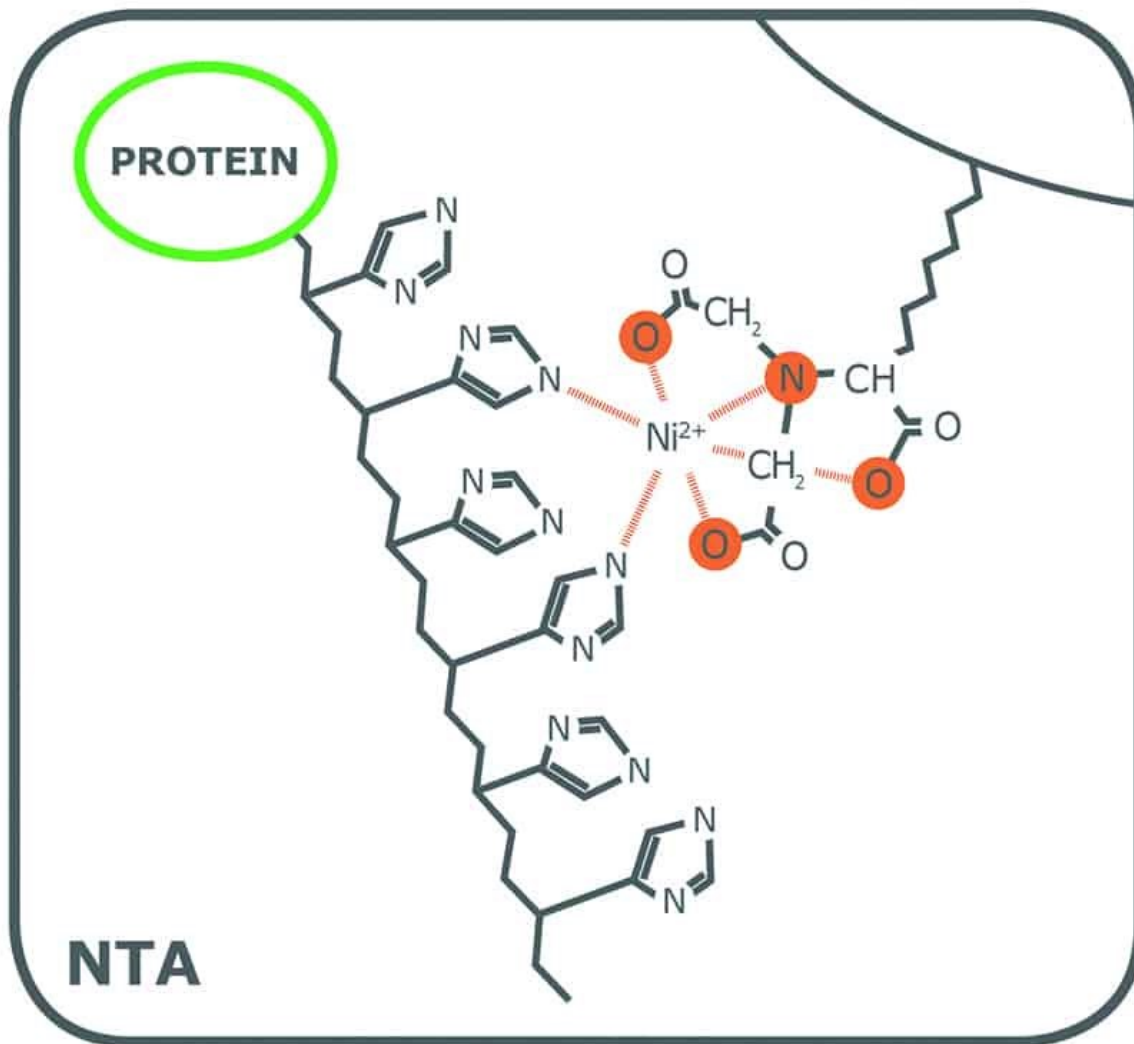
RESINA

Informazioni sul prodotto

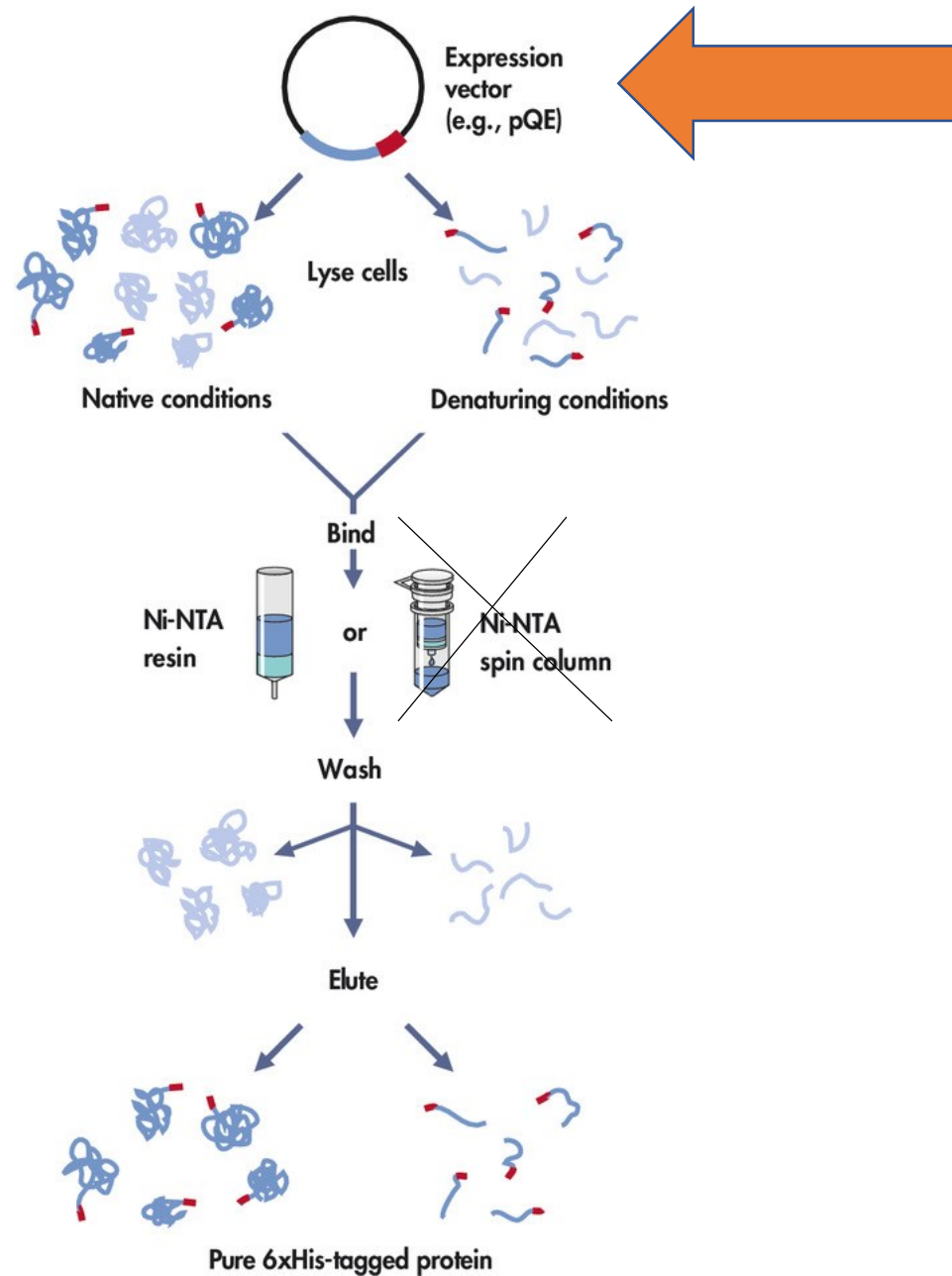
Il termine Ni-NTA (Nickel NTA) si riferisce a uno ione nickel 2^+ accoppiato all'acido nitrilotriacetico (NTA). Il Ni-NTA può quindi essere accoppiato alla resina di agarosio. Si tratta di un metodo di purificazione per ottenere proteine His-tagged funzionali.



10 mL € 157,00



Protein Purification with the Ni-NTA Protein Purification System



LEGA – LAVA - ELUISCI: i tre passaggi della purificazione per affinità

La maggior parte dei protocolli di purificazione per affinità segue gli stessi tre passaggi:

1. Legame: Una soluzione complessa contenente la proteina marcata viene applicata alla colonna e si lega in base all'interazione tag di affinità – matrice
2. Lavaggio: Altre proteine che si legano in modo non specifico vengono lavate via con opportuni tamponi
3. Eluizione: La proteina legata in modo specifico viene eluita dalla colonna, tipicamente mediante legame competitivo di una molecola simile (ad esempio istidina e imidazolo), tagliando il tag con una proteasi, o destabilizzando l'interazione tag di affinità - matrice ad es. con cambiando il pH

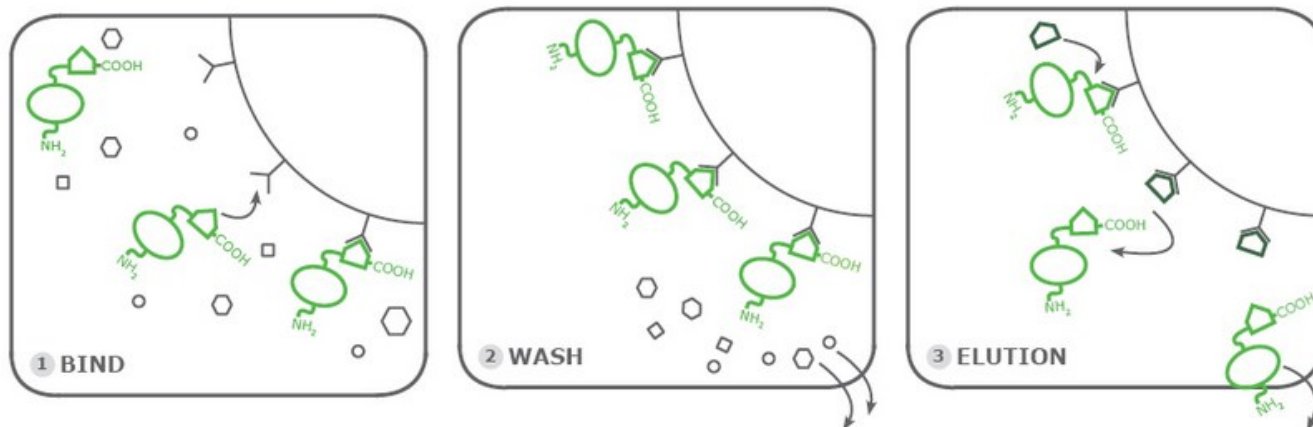
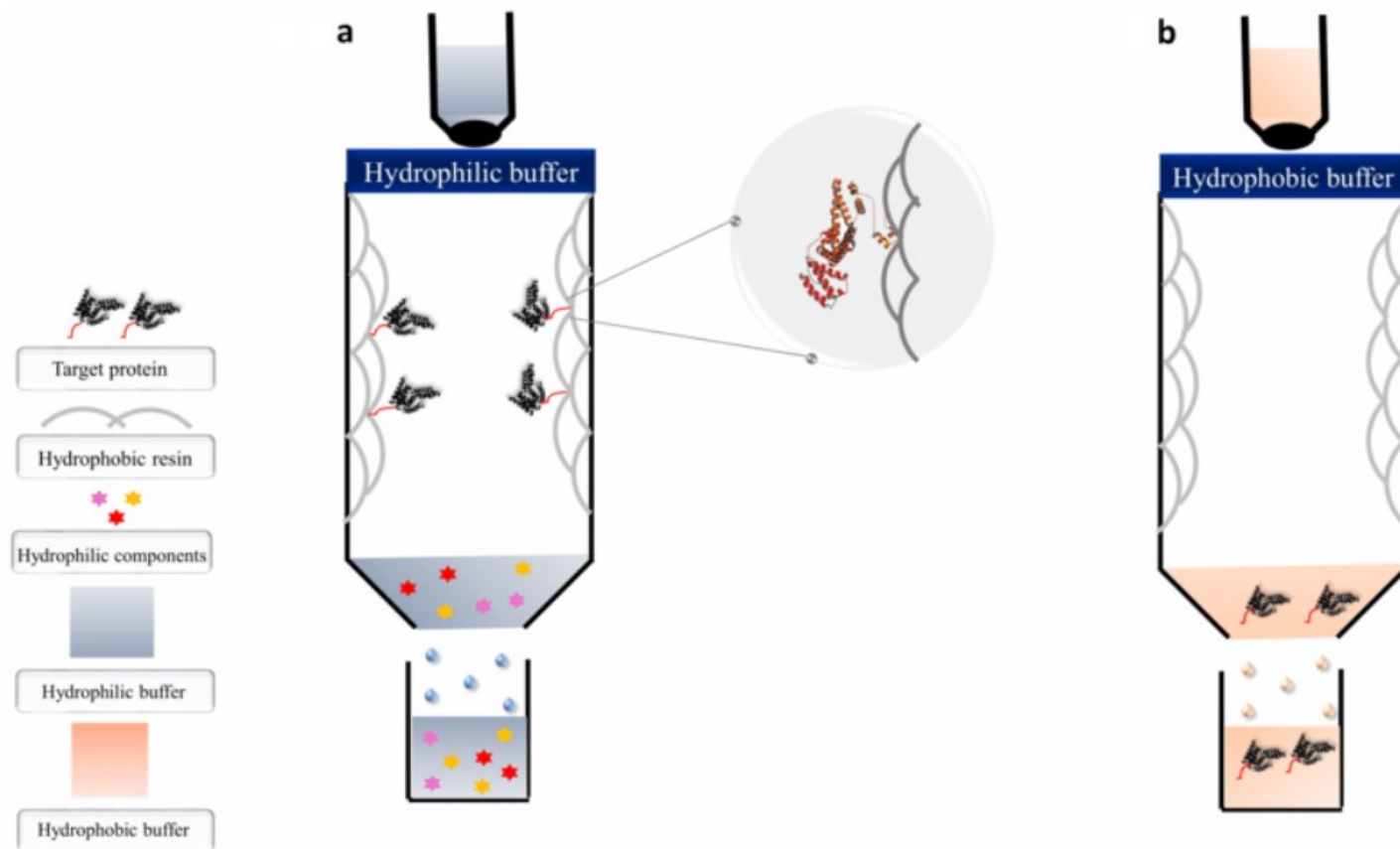


Fig. 4: Bind-wash-elute principle exemplified by an antibody-based affinity matrix (e.g. Rho1D4)

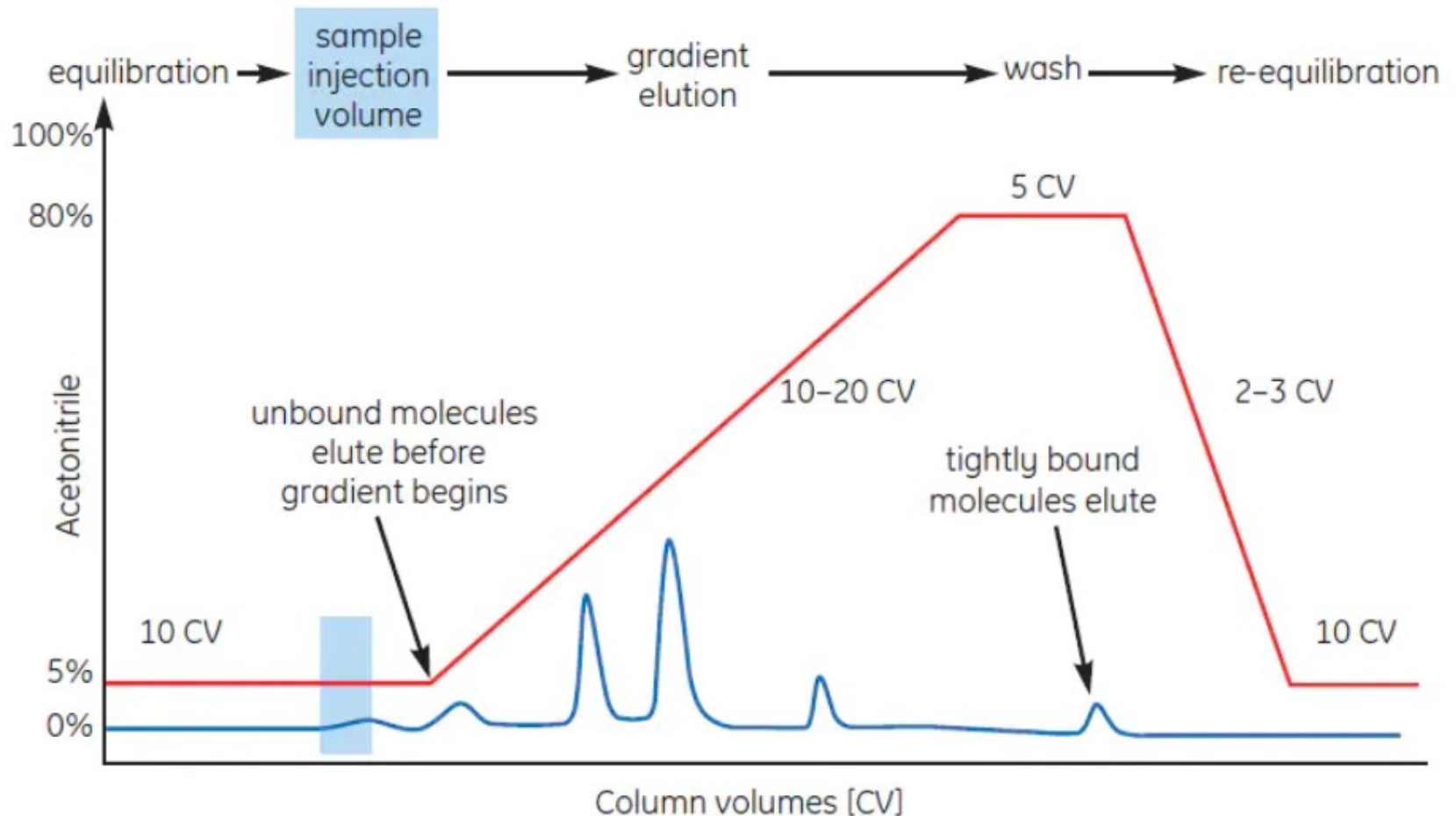
CROMATOGRAFIA A FASE INVERSA (RPC)

[A INTERAZIONE IDROFOBICA (HIC)]

- fase stazionaria idrofobica
 - fase mobile mista polare/non polare
 - Separa le proteine in base alle differenze di idrofobicità della loro superficie. Utilizza un'interazione reversibile tra le proteine e il ligando idrofobico di una resina RP.
- a) La miscela contenente la proteina di interesse in una soluzione tampone polare viene introdotta nella colonna e la proteina viene adsorbita alla fase stazionaria idrofobica mediante i residui idrofobici. Il contenuto idrofilico del campione eluisce per primo dalla colonna, a causa della sua affinità per la fase mobile idrofilica.
- b) Dopo l'eluizione del contenuto idrofilico, i componenti idrofobici, che sono adsorbiti alla colonna, possono essere eluiti mediante l'aggiunta di fase mobile caratterizzata da una graduale diminuzione di polarità. La diminuzione della polarità della fase mobile provoca l'indebolimento delle interazioni idrofobiche. Quindi le molecole meno idrofobiche eluiranno per prime e quelle con caratteristiche più idrofobiche per ultime.

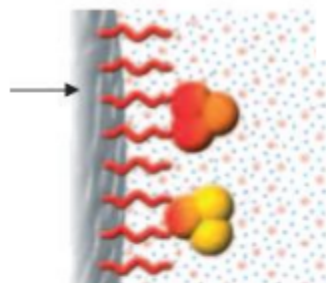


CROMATOGRAFIA A FASE INVERSA

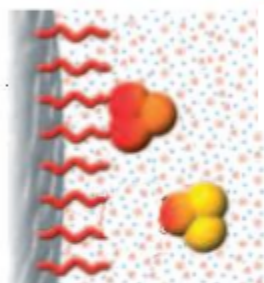


Esempio di cromatografia a fase inversa con un gradiente di eluizione
CV = Volumi di colonna

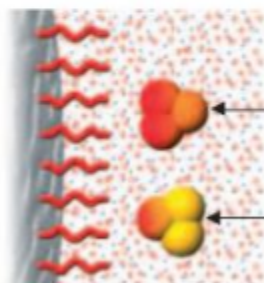
Reverse phase



95% H₂O, 0.05% TFA
5% CH₃CN, 0.05% TFA

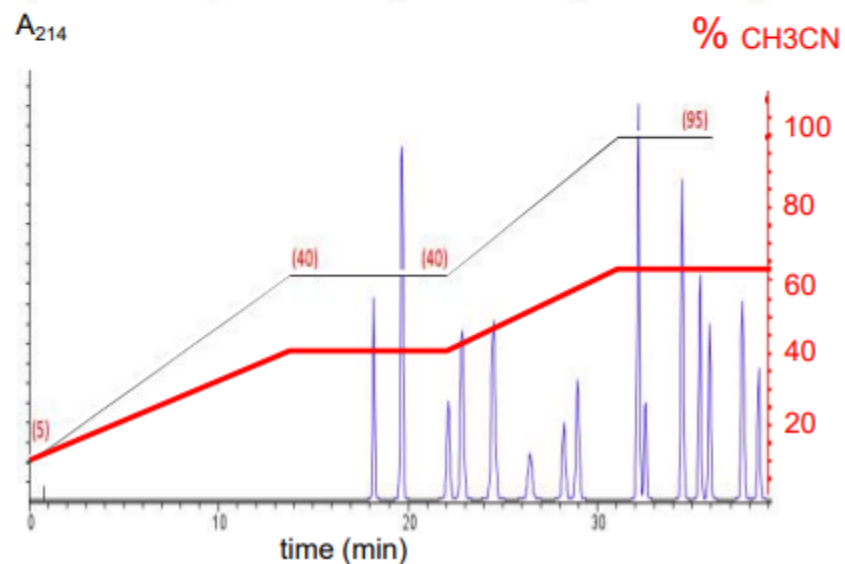
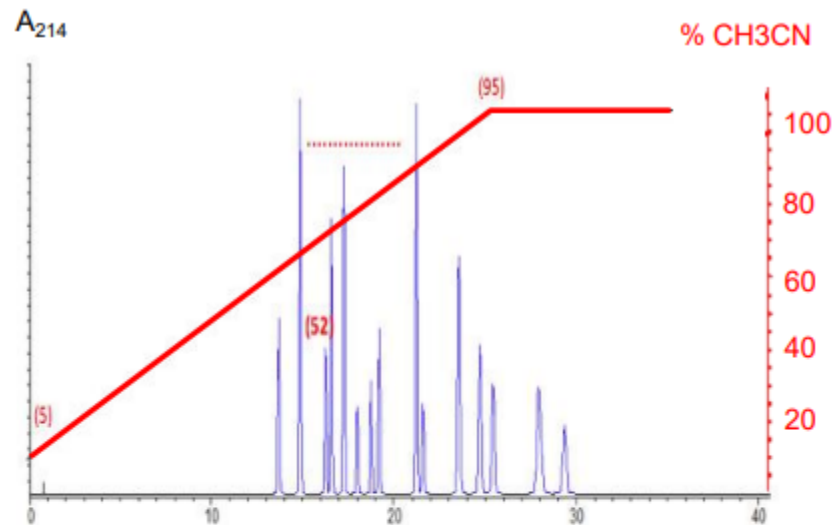
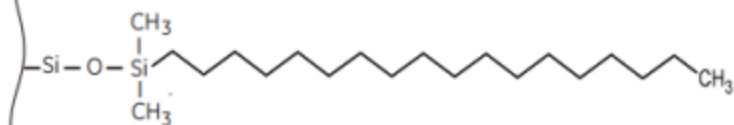


75% H₂O, 0.05% TFA
25% CH₃CN, 0.05% TFA



50% H₂O, 0.05% TFA
50% CH₃CN, 0.05% TFA

Less hydrophobic



VIDEO ON PROTEIN SEPARATION TECHNIQUES

<https://www.youtube.com/watch?v=MvcJuEaPiNQ>

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 μm 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)

A SECONDA DELLA PRESSIONE APPLICATA ALLA COLONNA:

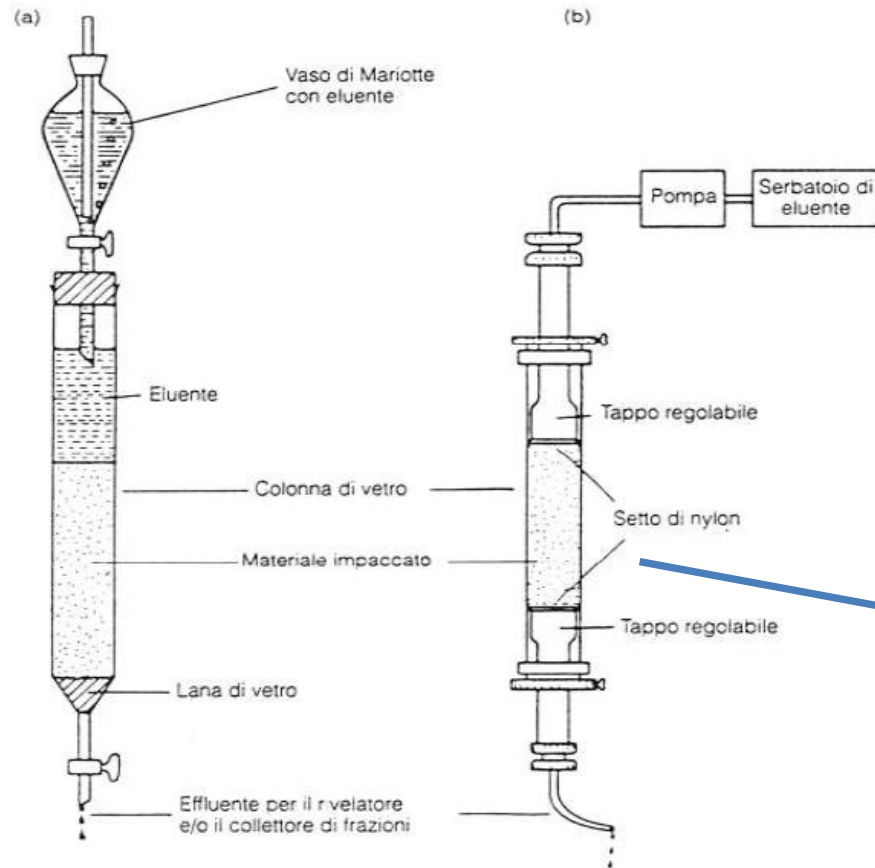
Cromatografia liquida a **bassa pressione (LPLC)** con pressioni inferiori ai 5 bar (1 bar= 0.1MPa)

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

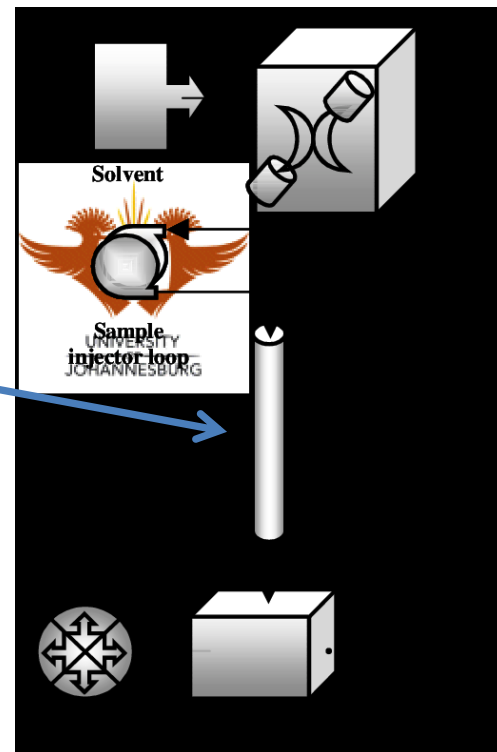
Cromatografia liquida ad **alta pressione (HPLC)** con pressioni superiori ai 50 bar

**In queste diverse condizioni,
cambia il tipo di resina e di
colonna utilizzate**

APPARATO PER CROMATOGRAFIA SU COLONNA



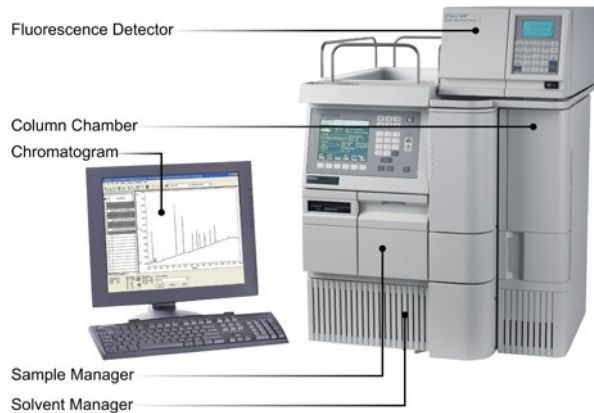
A valle della colonna:
rivelatore,
registratore,
collettore di frazioni



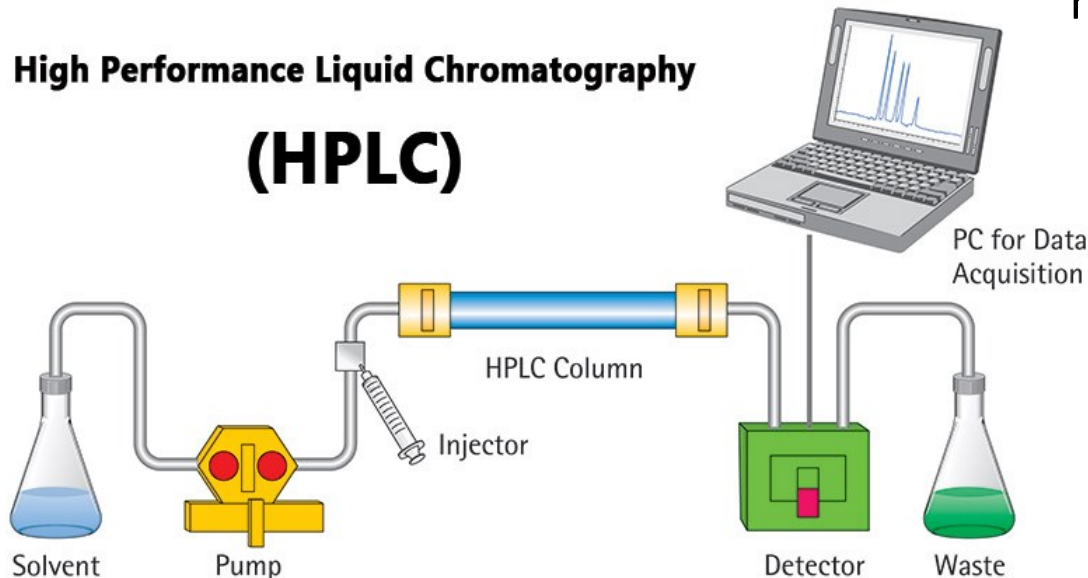
STRUMENTAZIONE PER HPLC

Un cromatografo HPLC è costituito dalle seguenti parti:

- bottiglia di eluenti : uno o più eluenti 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)

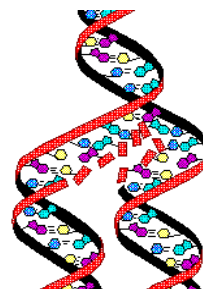


HPLC applications



Chemical

polystyrenes
dyes
phthalates



Bioscience

proteins
peptides
nucleotides



Pharmaceuticals

tetracyclines
corticosteroids
antidepressants
barbiturates



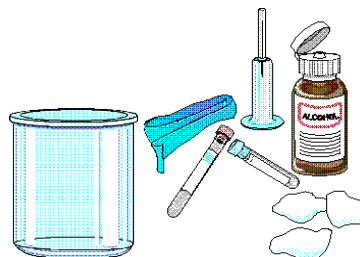
Consumer Products

lipids
antioxidants
sugars



Environmental

polyaromatic hydrocarbons
Inorganic ions
herbicides



Clinical

amino acids
vitamins
homocysteine