

CROMATOGRAFIA



CROMATOGRAFIA

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



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

CROMATOGRAFIA

La cromatografia indica un insieme di tecniche che servono a separare una miscela 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.**



CROMATOGRAFIA

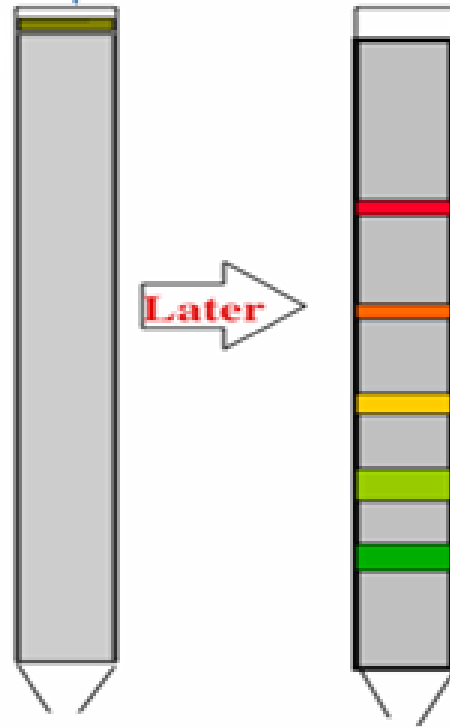
Scoperta nel 1906 - Mikhail Tswett
Botanico russo



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.

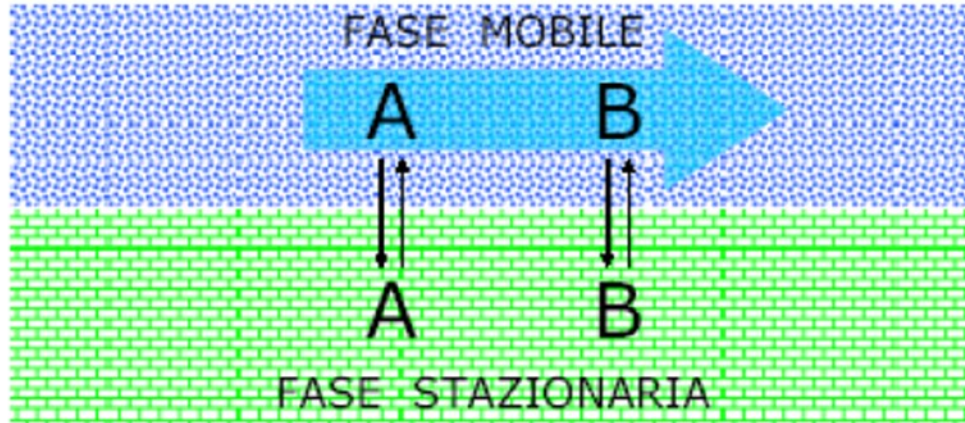
La prima separazione cromatografica, di due pigmenti colorati, su fogli di papiro, risale al 500 a.C., in Egitto: ne parla [Plinio il Vecchio](#) (23-29) nella sua *Historia Naturalis*.

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.

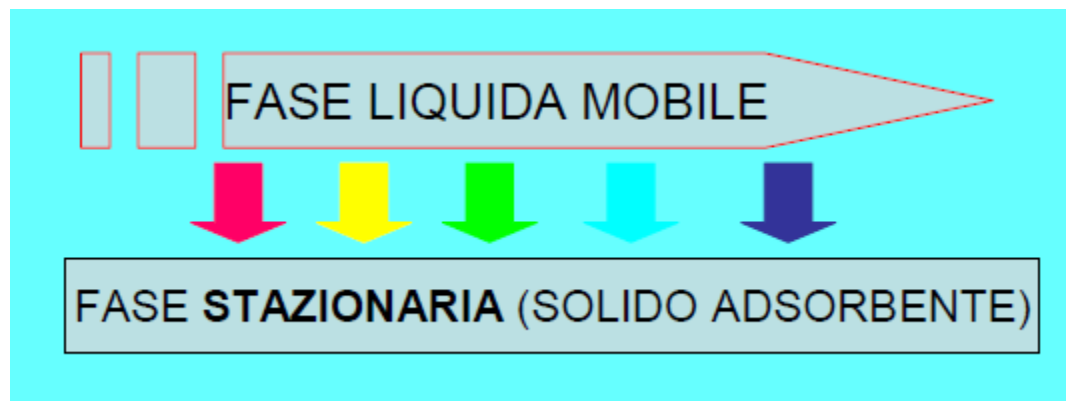
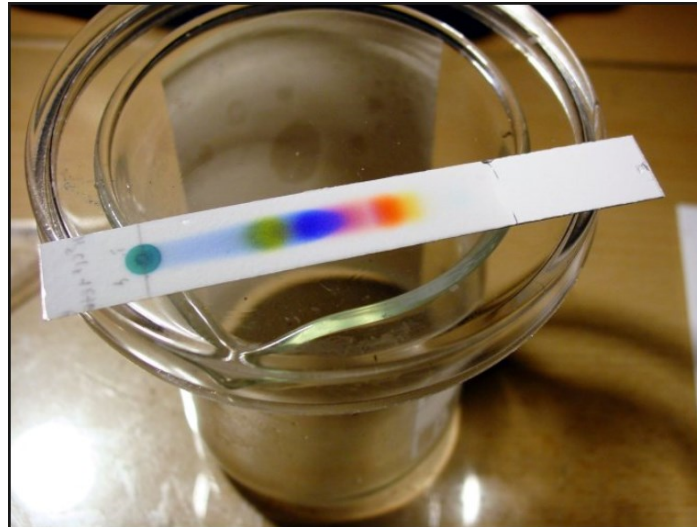
SEPARAZIONE DI DUE SOSTANZE MEDIANTE CROMATOGRAFIA



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

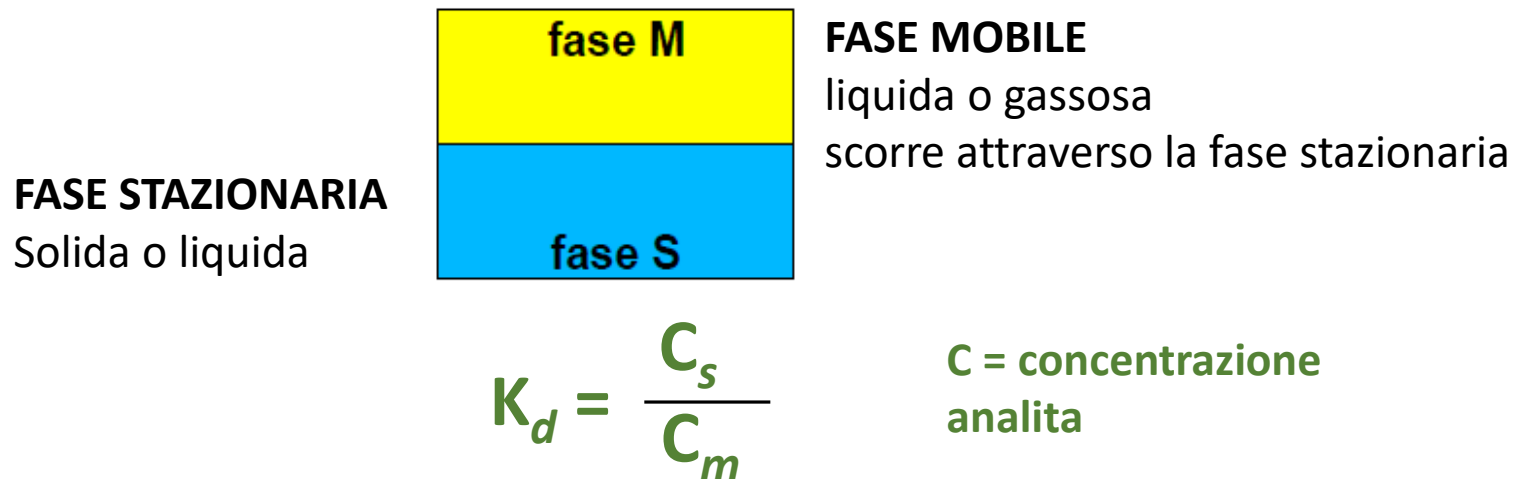
Una cromatografia si basa sul fatto che i vari componenti di una miscela tendono a ripartirsi in modo diverso tra due fasi, in funzione della loro affinità con ciascuna di esse.

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



COEFFICIENTE DI DISTRIBUZIONE

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

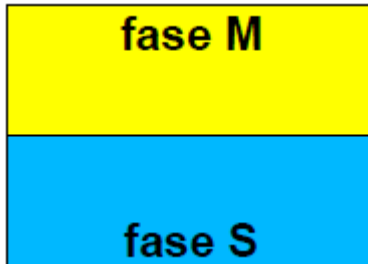


Le due fasi sono scelte in modo che i composti da separare abbiano differenti coefficienti di distribuzione

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.

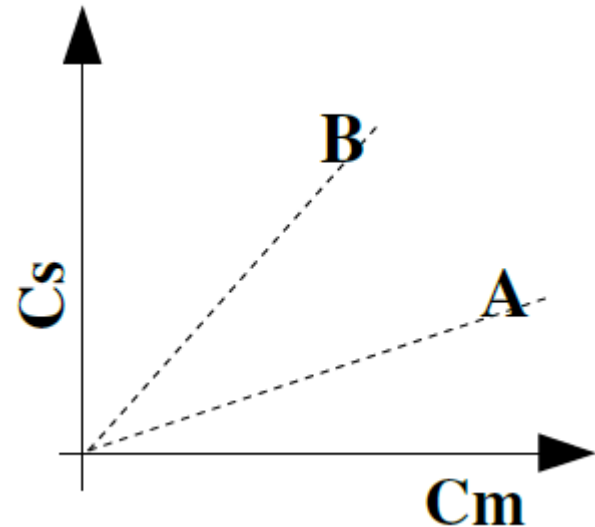
COEFFICIENTE DI DISTRIBUZIONE

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

Nella figura è riportata la retta, detta **isoterma di distribuzione**, di due sostanze A e B per le quali $K_{dA} < K_{dB}$

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

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



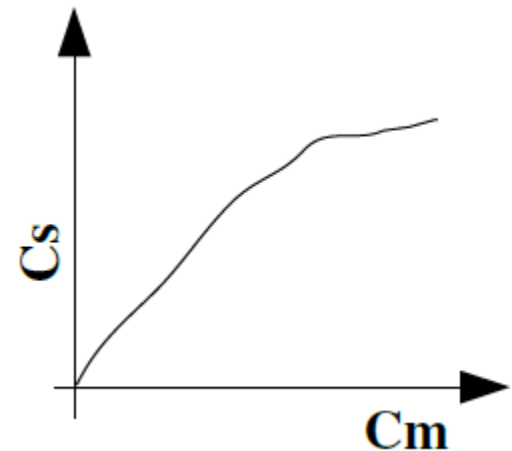
COEFFICIENTE DI DISTRIBUZIONE

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

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

Perché?

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



Coefficiente **effettivo** di distribuzione 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

Se $K_D=1$ la concentrazione del composto nelle fasi A e B è uguale.

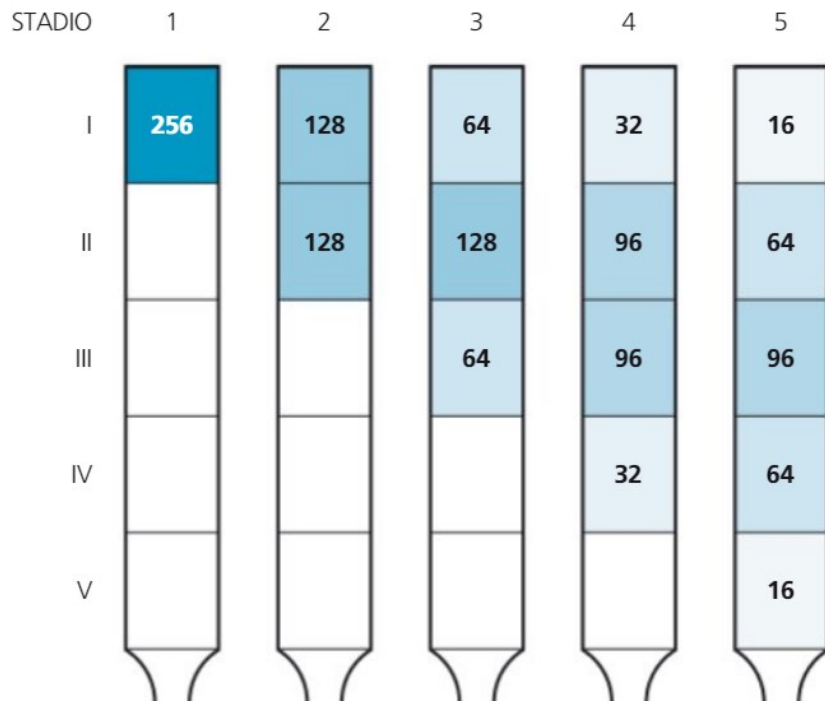
Ma se $V_S = 10 \text{ cm}^3$ e $V_M = 1 \text{ cm}^3$

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

$$k'_D = \frac{[X]_S V_S}{[X]_M V_M} = K_D \frac{V_S}{V_M} \qquad k'_D = 1 \frac{10}{1} = 10$$

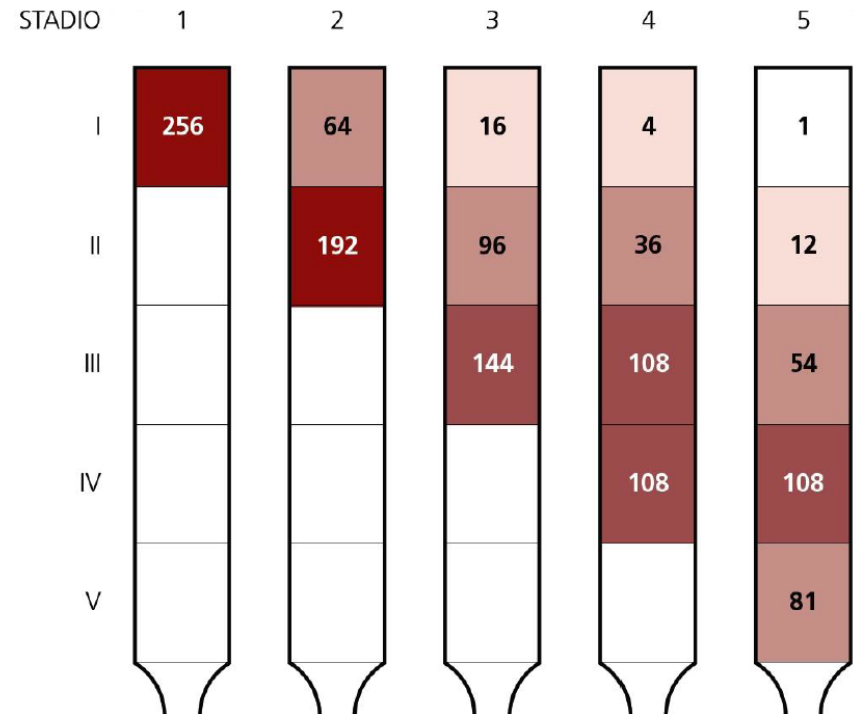
Principio di funzionamento della cromatografia per due sostanze con Kd diverso

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



Kd=1

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

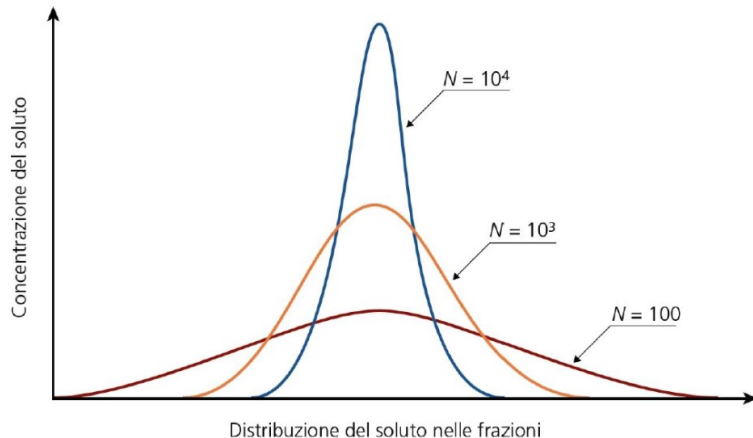


Kd=1/3

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

Dalla forma di un picco si può ricavare il numero di piatti teorici N per una cromatografia, che considera il tempo di ritenzione (t_R) e l'ampiezza del picco alla base (W): **$N = 16 (T_1/W)^2$** (teoria classica della cromatografia)

Migliore una colonna, minore è l'altezza del piatto teorico.



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

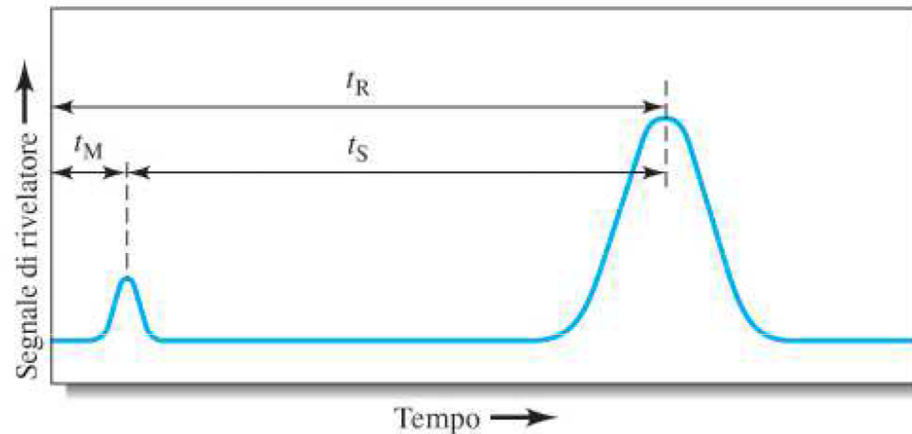
I **principali parametri cromatografici** sono quattro:

- 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: $t_S = t_R - t_M$

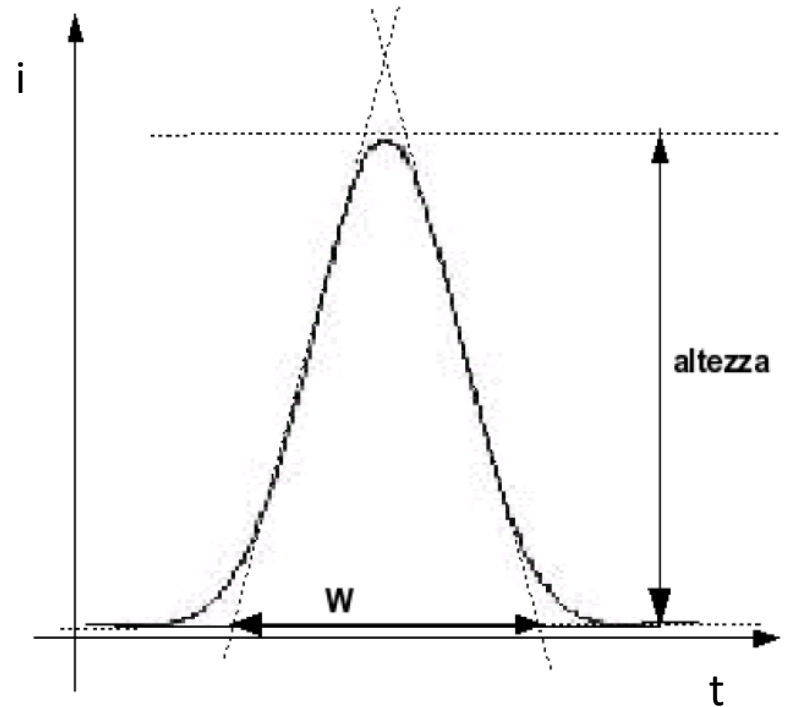
I picchi e il cromatogramma

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.

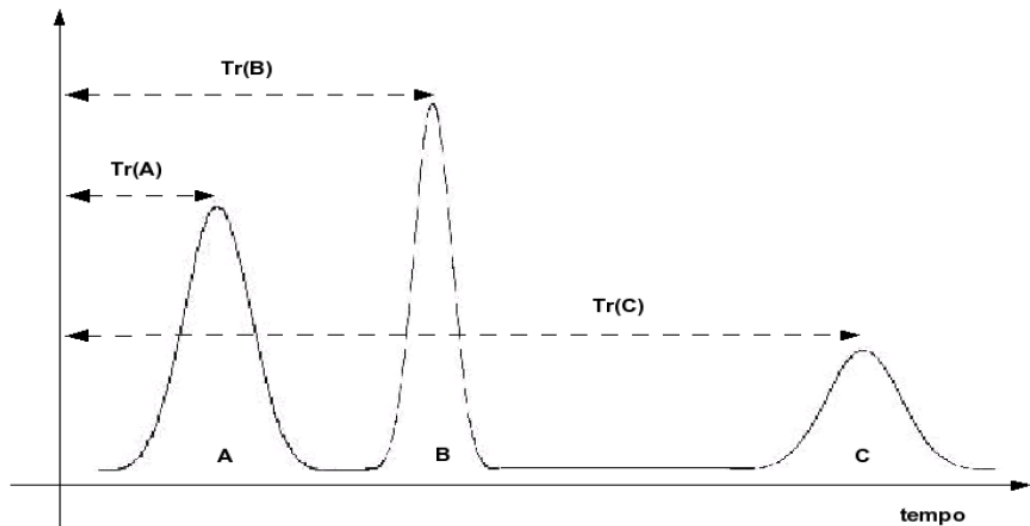
A questo punto, dal grafico (oltre ad altezza e ampiezza dei picchi) si determinano due parametri essenziali:

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

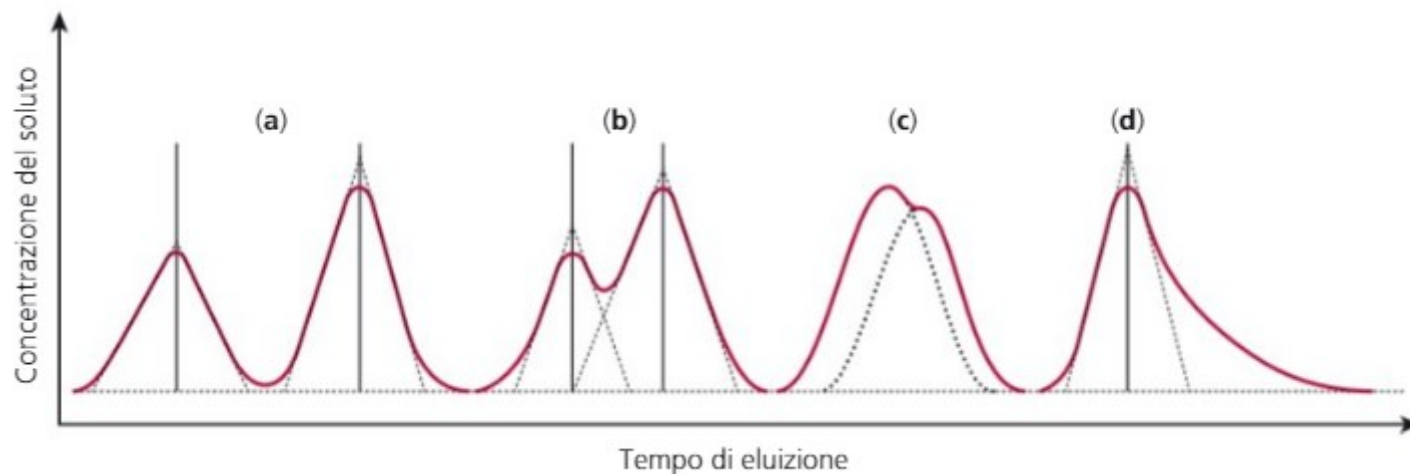


Il buon esito di ogni procedura cromatografica si valuta mediante la capacità di separare completamente (risolvere) un composto da una miscela di altri composti. La risoluzione dei picchi dipende dalla loro larghezza e dalla loro vicinanza.

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.

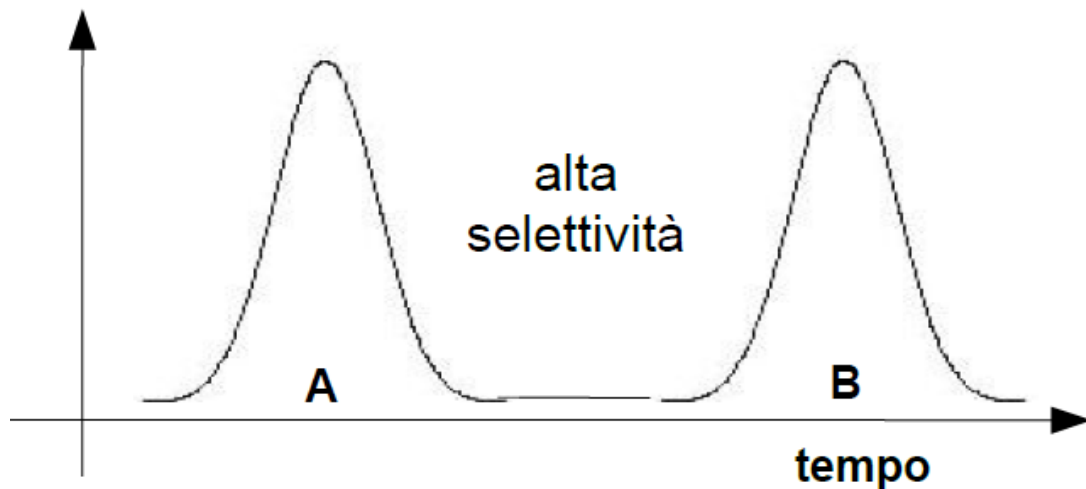
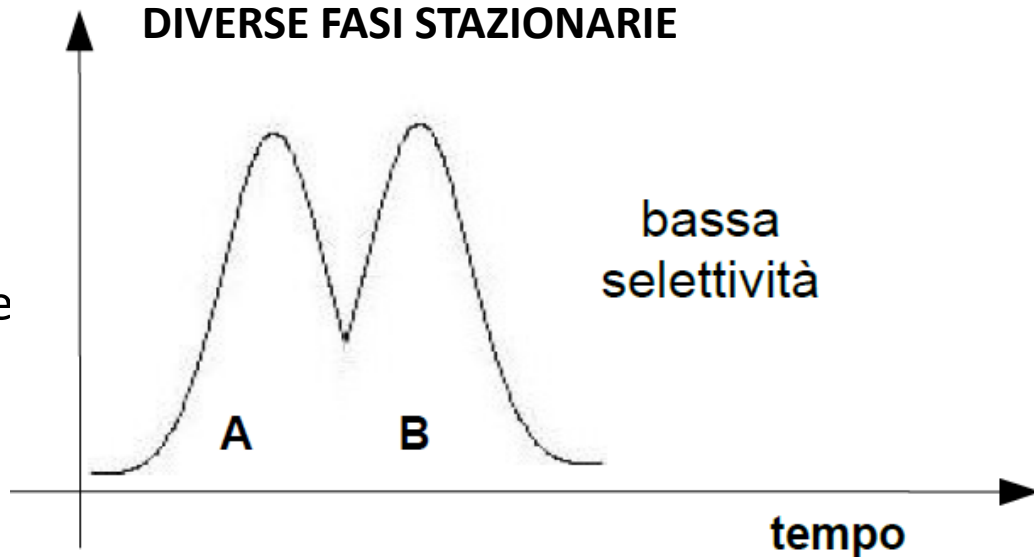


Risoluzione dei picchi di eluizione di una colonna cromatografica. La figura mostra: (a) la separazione completa di due molecole; picchi; (b) una separazione incompleta con sovrapposizione dei due picchi; (c) la separazione è talmente scarsa che il picco mostra una gobba, dovuta alla sovrapposizione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

SELETTIVITÀ

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

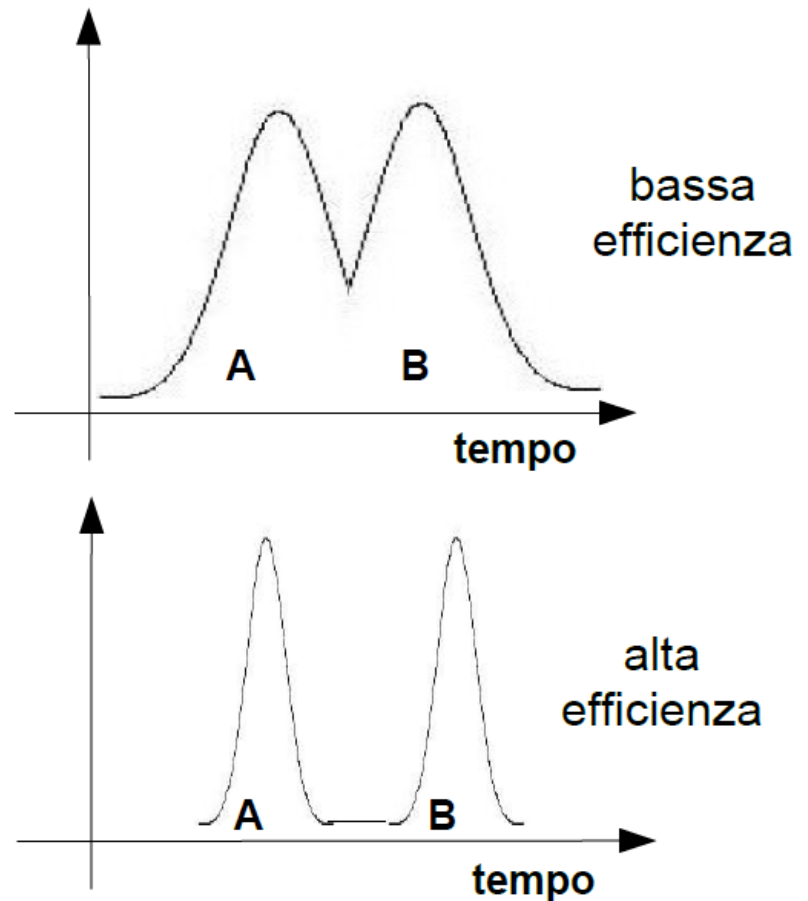
Capacità del sistema cromatografico di mantenere compatta la banda di eluizione di una sostanza lungo tutto il percorso della fase mobile.

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

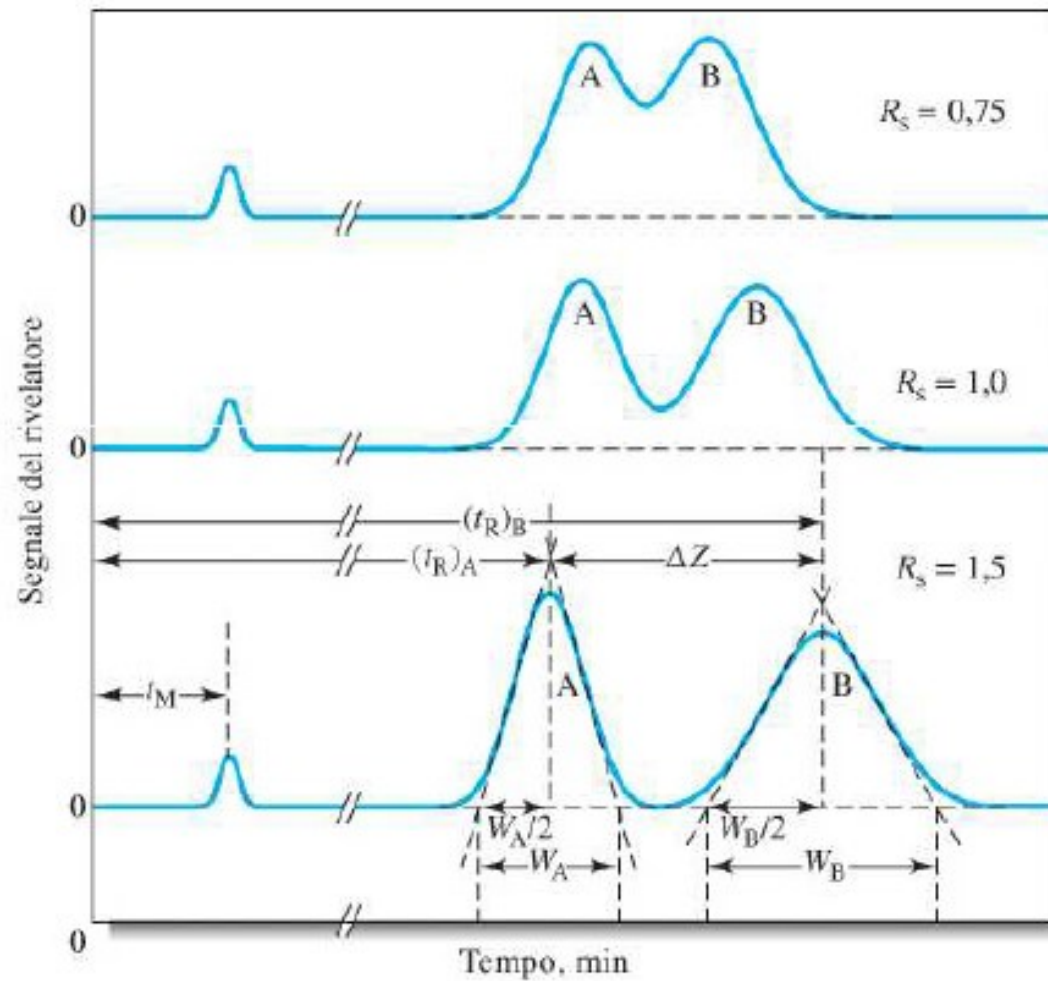
Questo fattore tiene conto sia della selettività che dell'efficienza, e indica il grado di effettiva separazione ottenuto per due sostanze in un processo cromatografico.

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

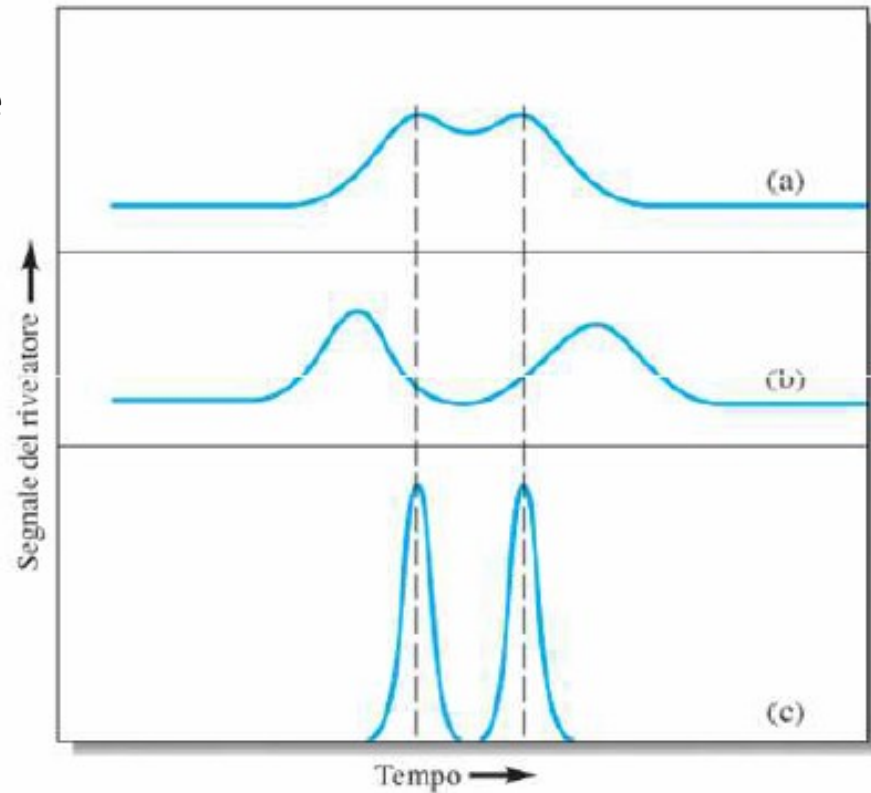


SEPARAZIONE OTTIMALE

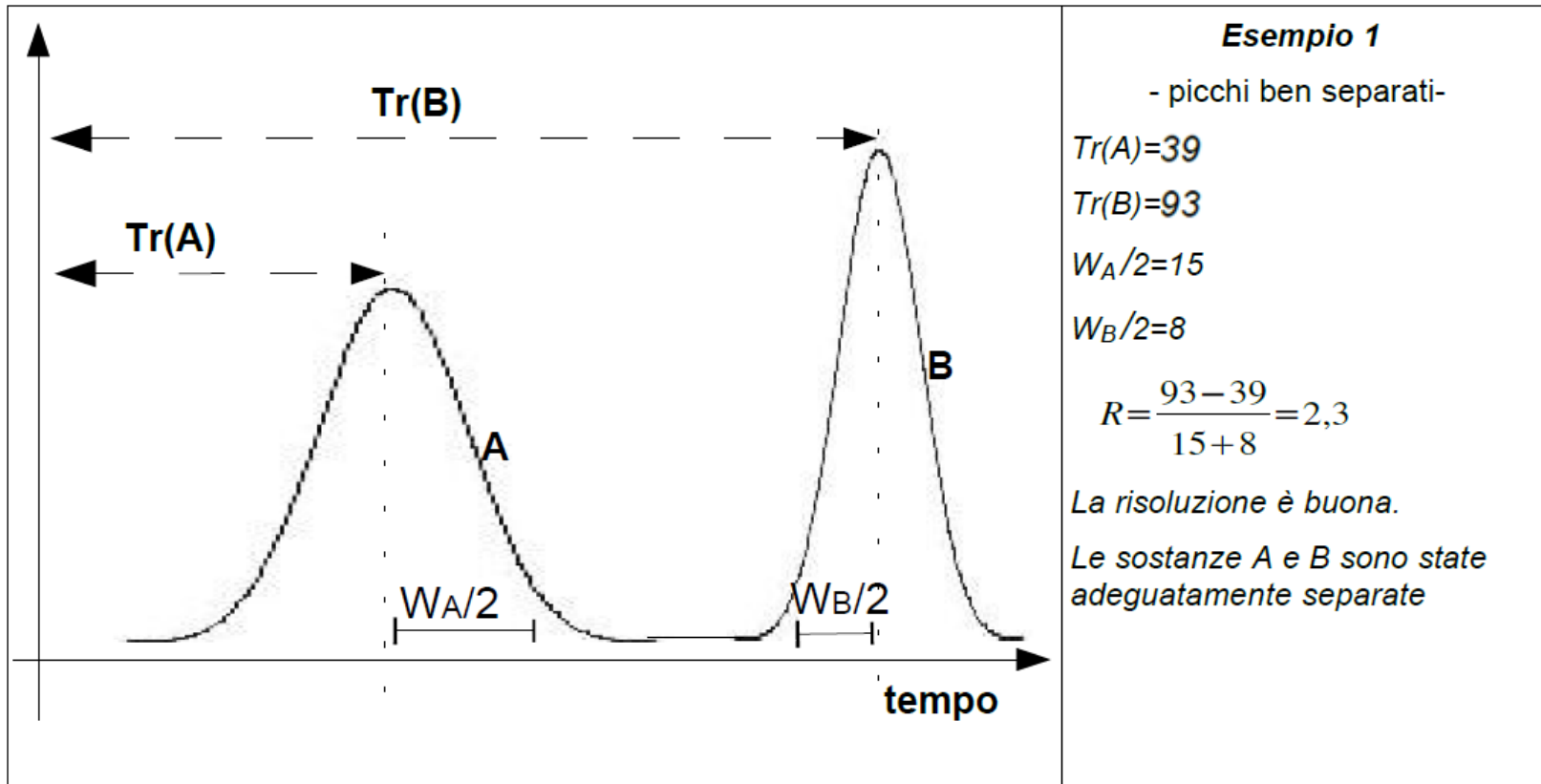
a) separazione con scarsa risoluzione e basso N

b) migliora la risoluzione ma N è sempre basso

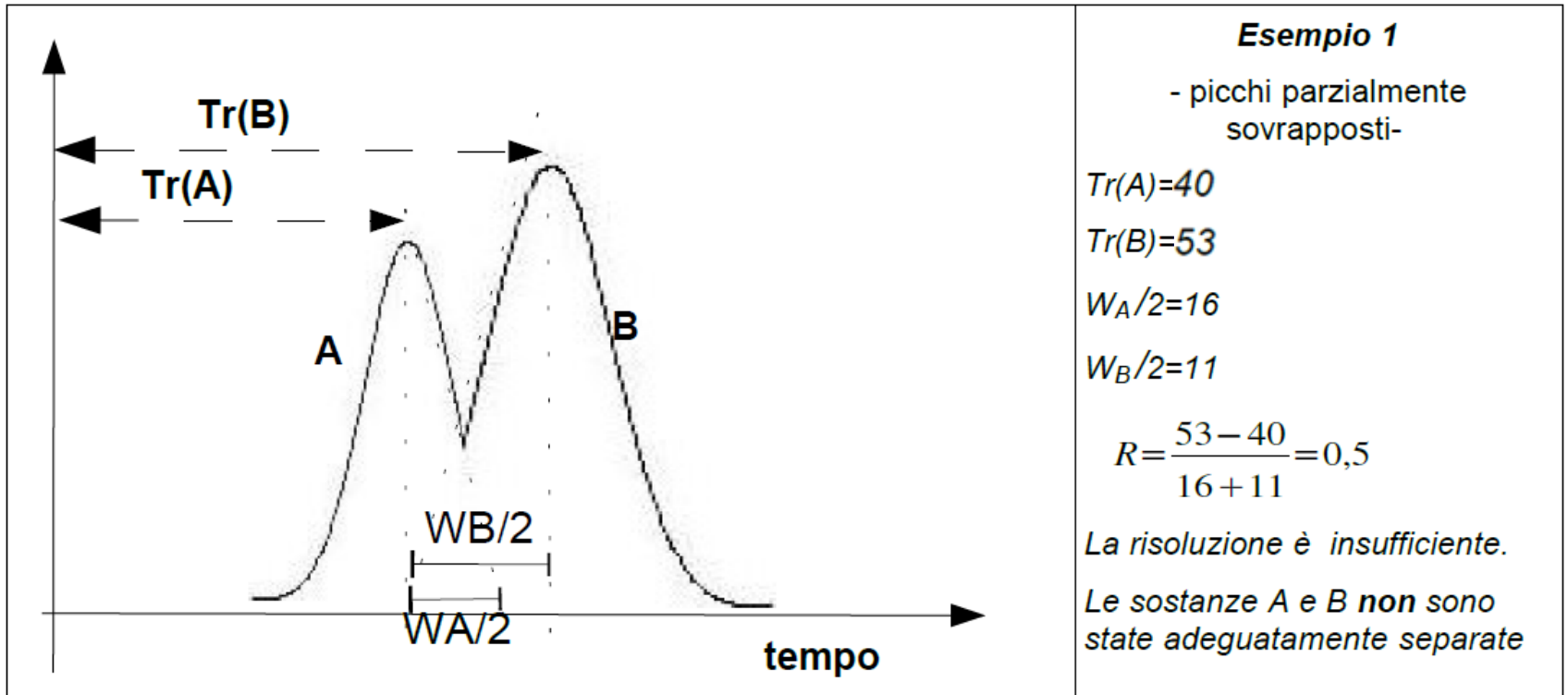
c) ottima risoluzione e buono N



ESEMPIO DI SEPARAZIONE



ESEMPIO 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.

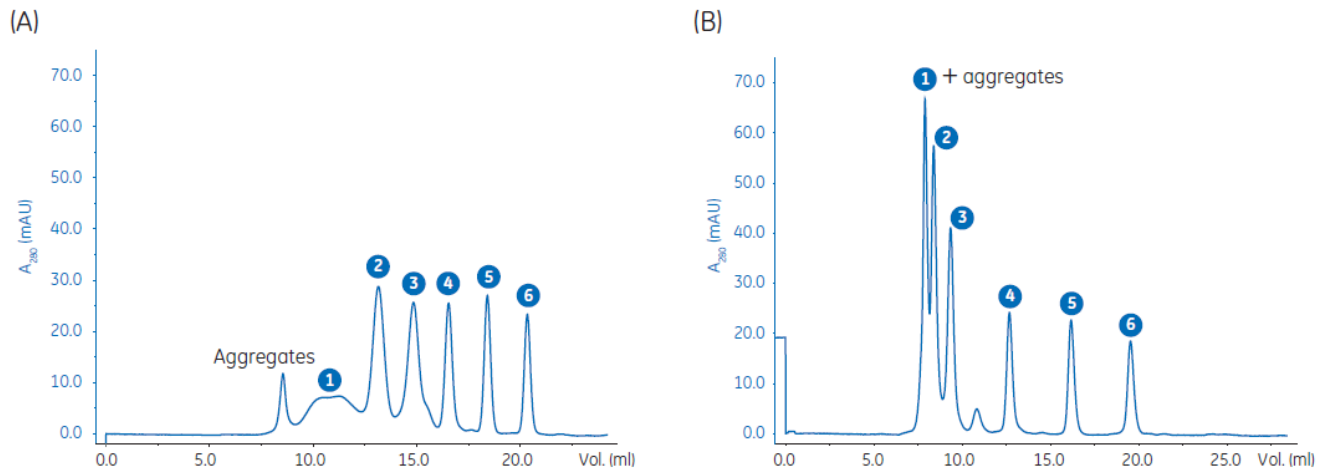


Fig 1.7. Chromatograms showing high-resolution SEC of six standard proteins on (A) Superose 6 Increase 10/300 GL and (B) Superdex 200 Increase 10/300 GL.

CLASSIFICAZIONE DELLE TECNICHE CROMATOGRAFICHE



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

STATO FISICO DELLA FASE MOBILE



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

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

FORMA DEL SUPPORTO CROMATOGRAFICO



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

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

MECCANISMI DELLA SEPARAZIONE



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

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

TECNICHE CROMATOGRAFICHE



In base alla forma del letto cromatografico

- Cromatografia su colonna
- Cromatografia planare

In base allo stato fisico della fase mobile

- Cromatografia liquida
- Gascromatografia
- Cromatografia fluida supercritica

In base al meccanismo di separazione

- Adsorbimento
- Ripartizione
- Scambio ionico
- Esclusione
- Affinità

INTERAZIONE SOLUTO-FASI



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

Sono sfruttate a scopo separativo le seguenti interazioni:

- legami a idrogeno
- Forze di Van der Waals (interazioni dipolo-dipolo)
- Formazione di composti di interazione 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
- la fase mobile viene fatta eluire in continuo attraverso la fase stazionaria, che deve essere immiscibile nell'eluente
- la fase stazionaria (liquida o solida) si trova all'interno di una *colonna* oppure è supportata su una *superficie piana*
- la fase mobile e la fase stazionaria sono scelte in modo che i componenti della miscela da separare si distribuiscano tra le due fasi
 - i componenti più affini alla fase stazionaria passeranno più tempo in questa fase, quindi si sposteranno più lentamente attraverso il sistema
 - i componenti più affini alla fase mobile si sposteranno invece più velocemente
- la separazione dei componenti avviene in quanto ogni sostanza ha una distribuzione caratteristica tra le due fasi (costante di ripartizione $K_d = C_s/C_m$)

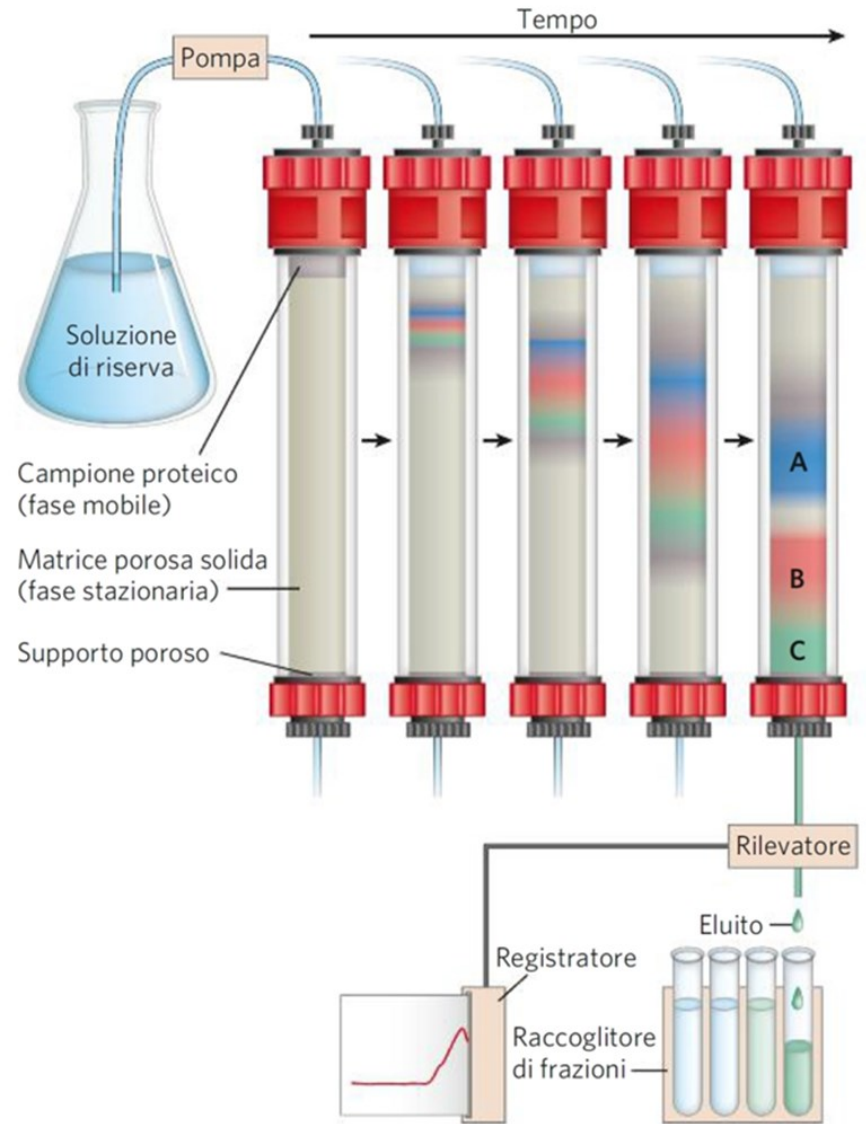
CROMATOGRAFIA SU COLONNA

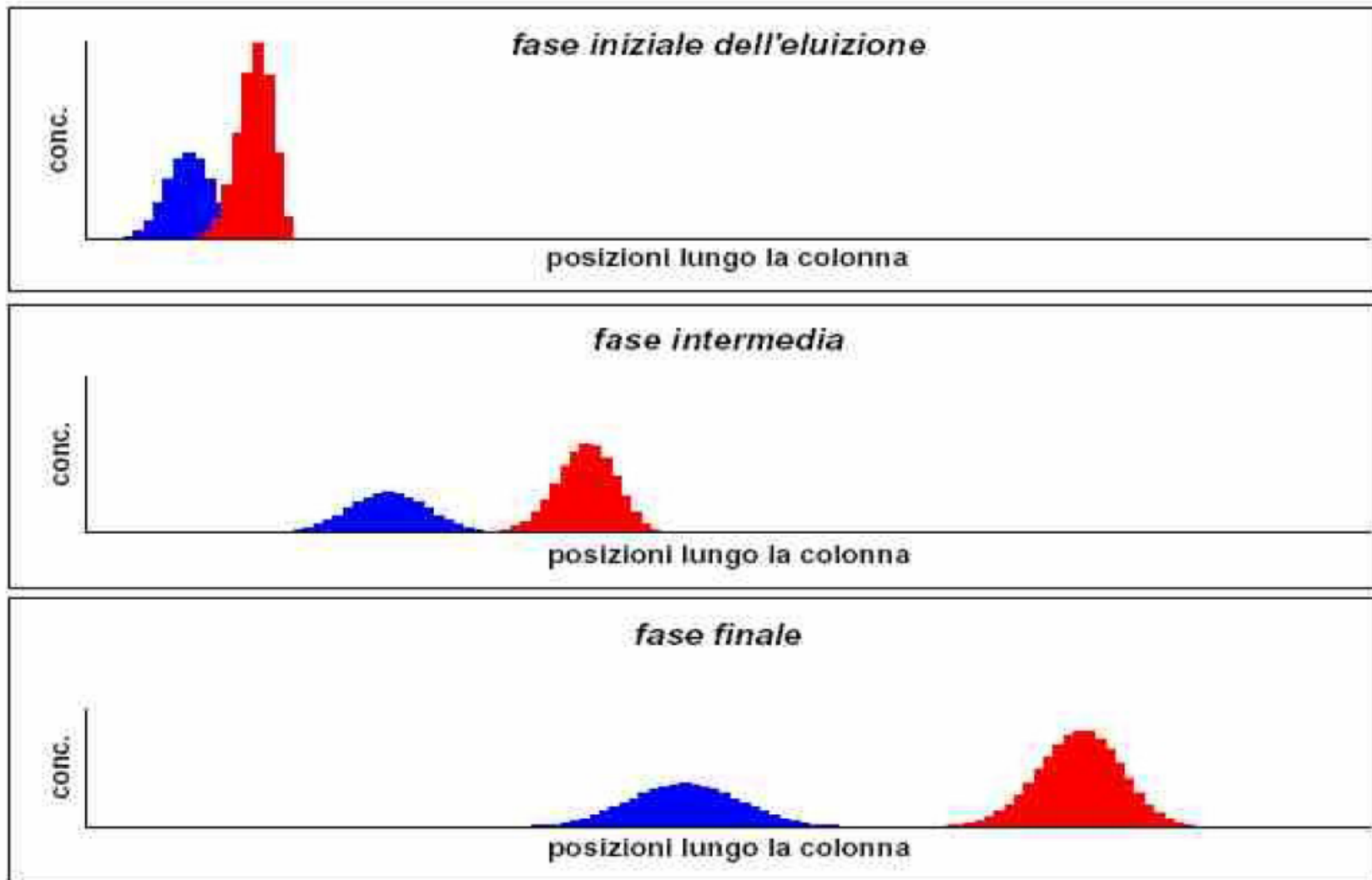
ESPERIMENTO FONDAMENTALE: illustra il principio su cui si basa la cromatografia

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

CROMATOGRAFIA SU COLONNA

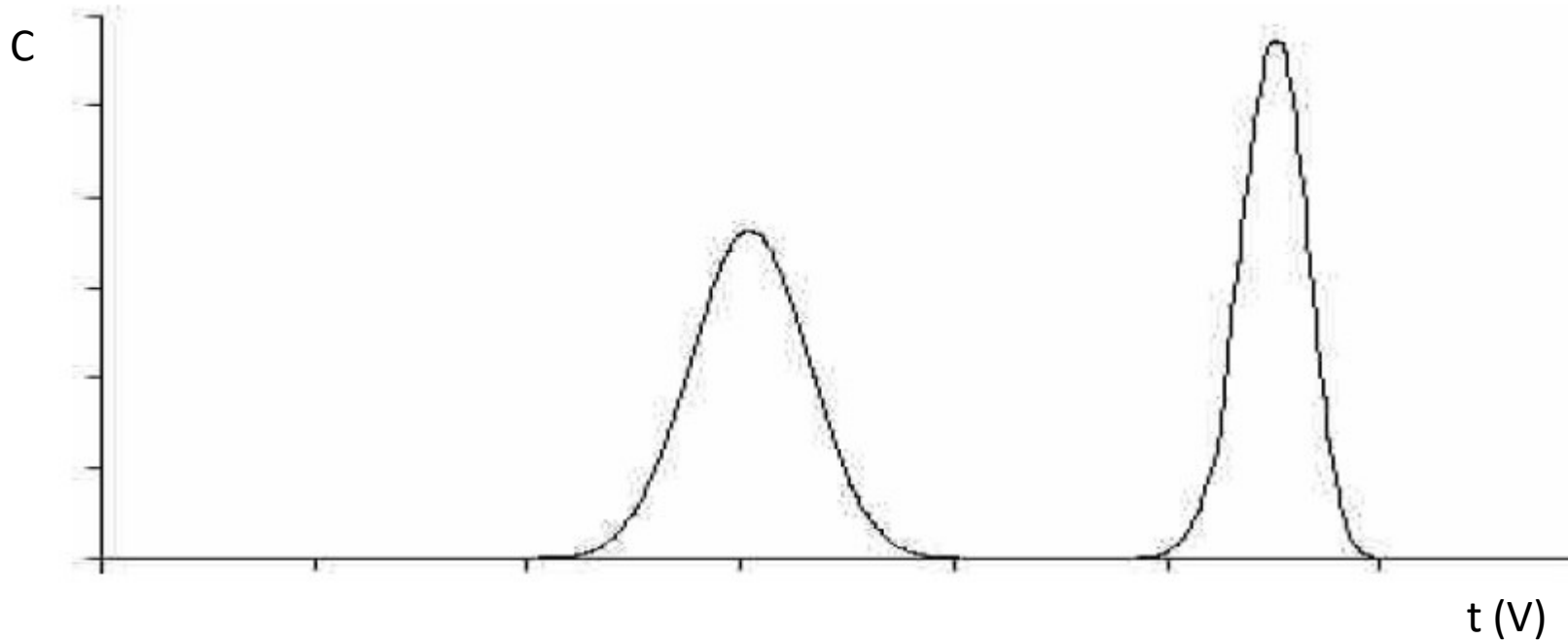
Metodo molto utilizzato per la separazione delle proteine.
Sfrutta differenze di carica, grandezza, affinità di legame per una specifica molecola (chiamata ligando)





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***).

CROMATOGRAMMA

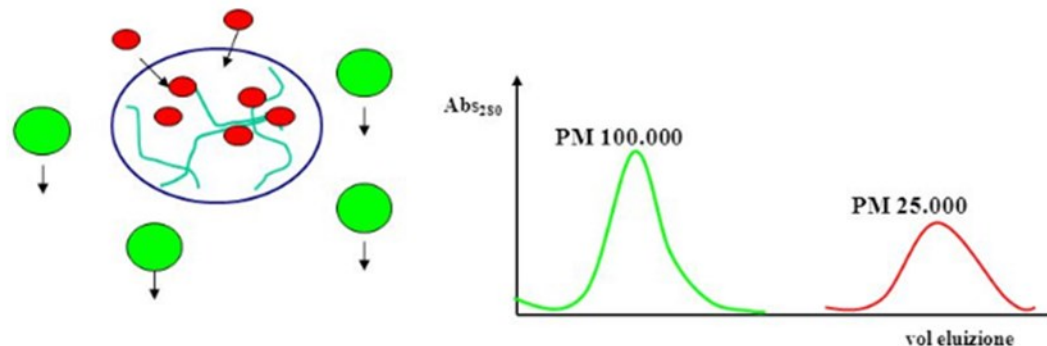


Se si misura la concentrazione delle sostanze in uscita dalla colonna si ottiene il cosiddetto ***cromatogramma***, che riporta le **concentrazioni** di sostanza in uscita in funzione del **tempo** o del **volume** di eluente

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

Si usano colonne con diametro piuttosto piccolo e lunghe

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

Volume totale (V_T) = $V_0 + V_i + V$ 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

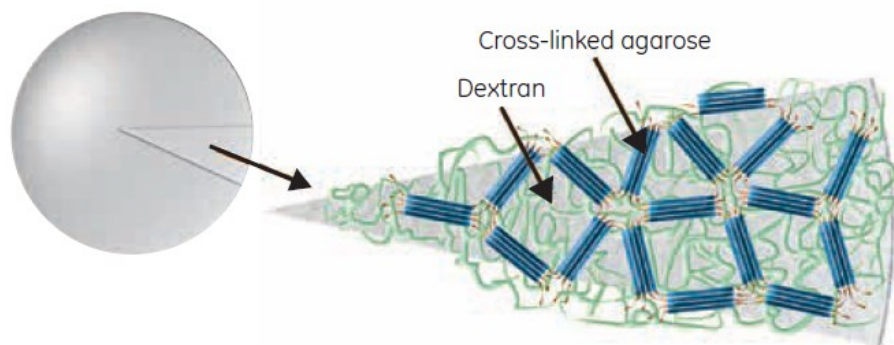


Fig 2.1. A schematic section of a Superdex particle. In Superdex, the dextran chains are covalently linked to a highly cross-linked agarose matrix.

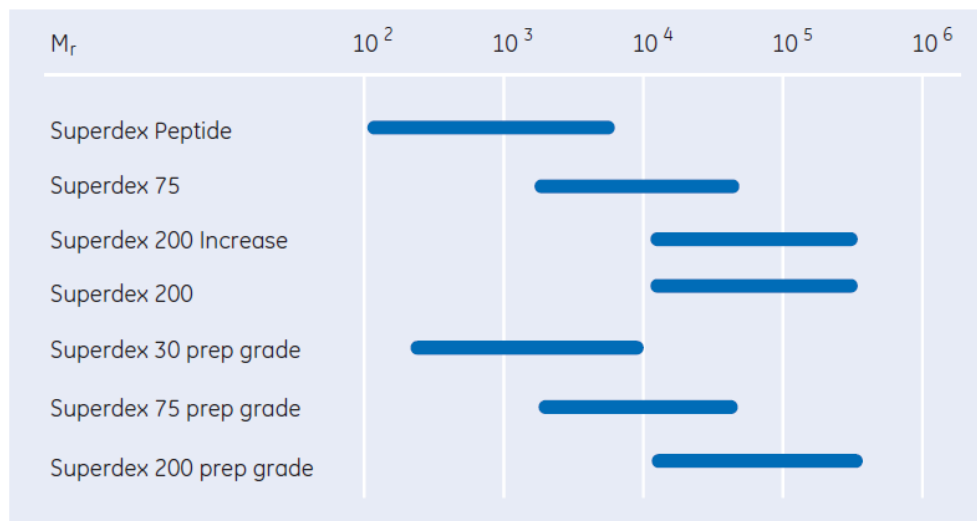
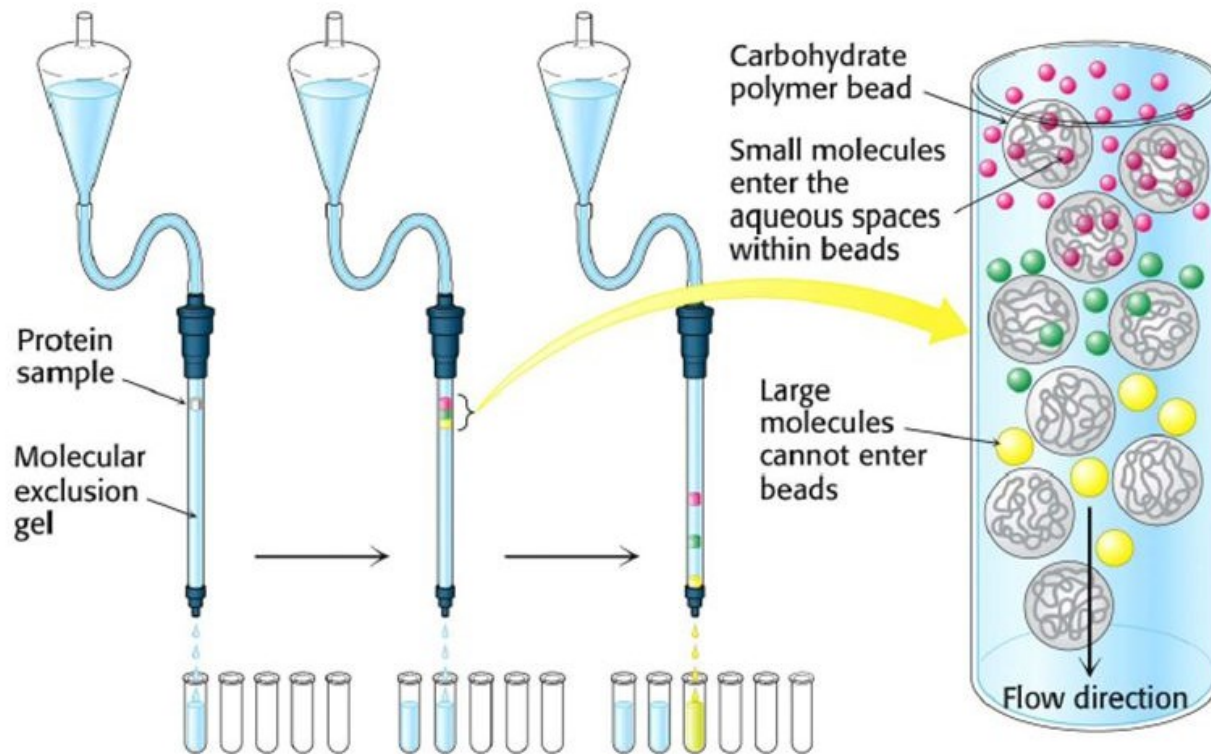


Fig 2.2. Fractionation ranges for Superdex.

CROMATOGRAFIA DI ESCLUSIONE DIMENSIONALE



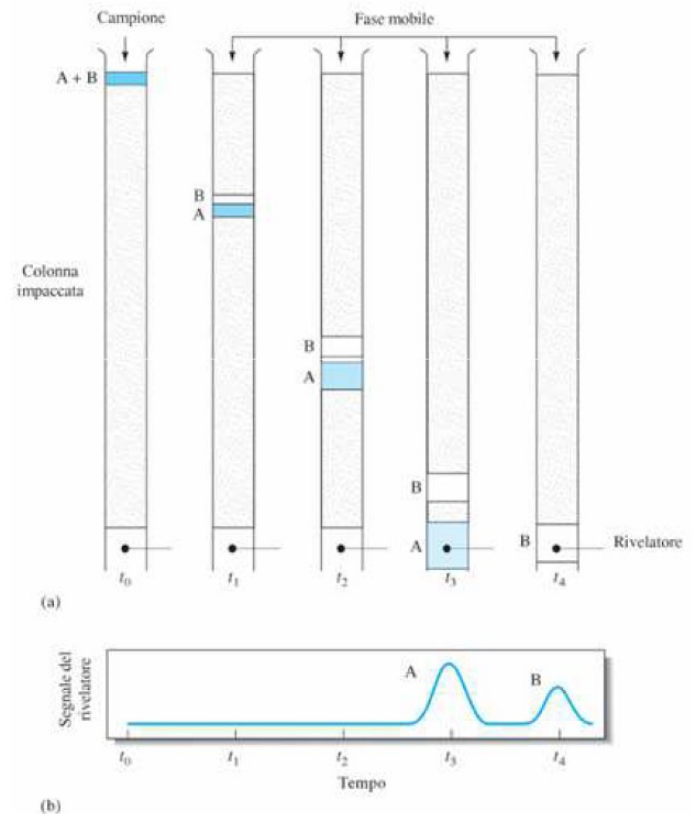
Le molecole grandi non entrano nei pori e passano attraverso la Fase S senza essere trattenute; molecole molto piccole trascorrono molto tempo nella Fase S. Solo entro una dimensione critica esiste una relazione tra tempo di permanenza e dimensione molecolare, che può essere utilizzata per separazione.

VISUALIZZAZIONE DELLA SEPARAZIONE

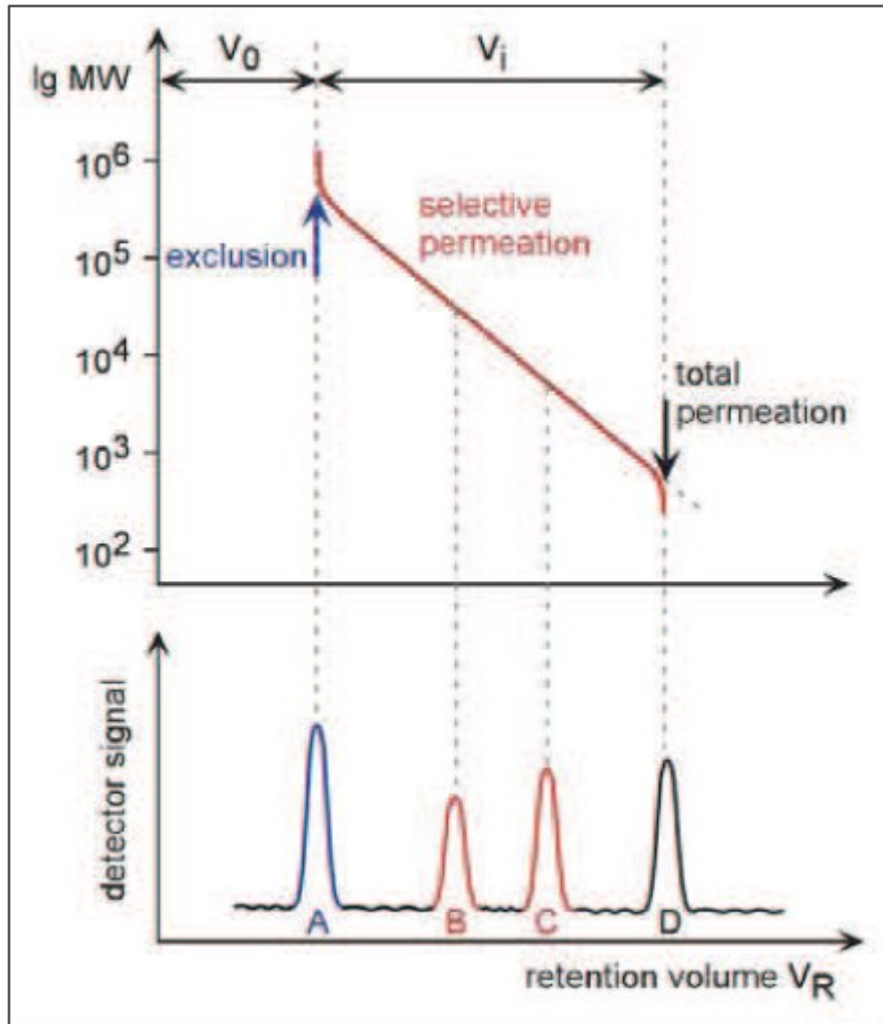
Ponendo all'uscita della colonna un rivelatore che misuri la concentrazione del soluto nell'eluato (cioè la fase mobile che esce dalla colonna) e riportando il segnale in funzione del tempo si può ottenere un cromatogramma.

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

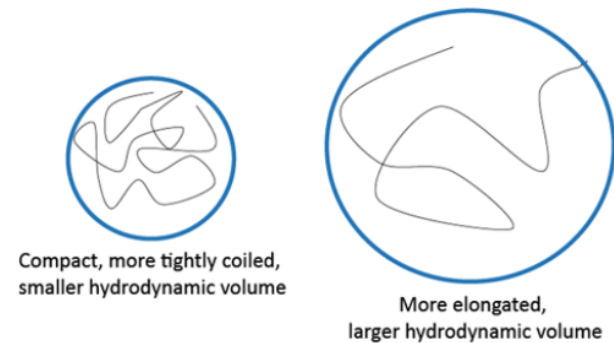
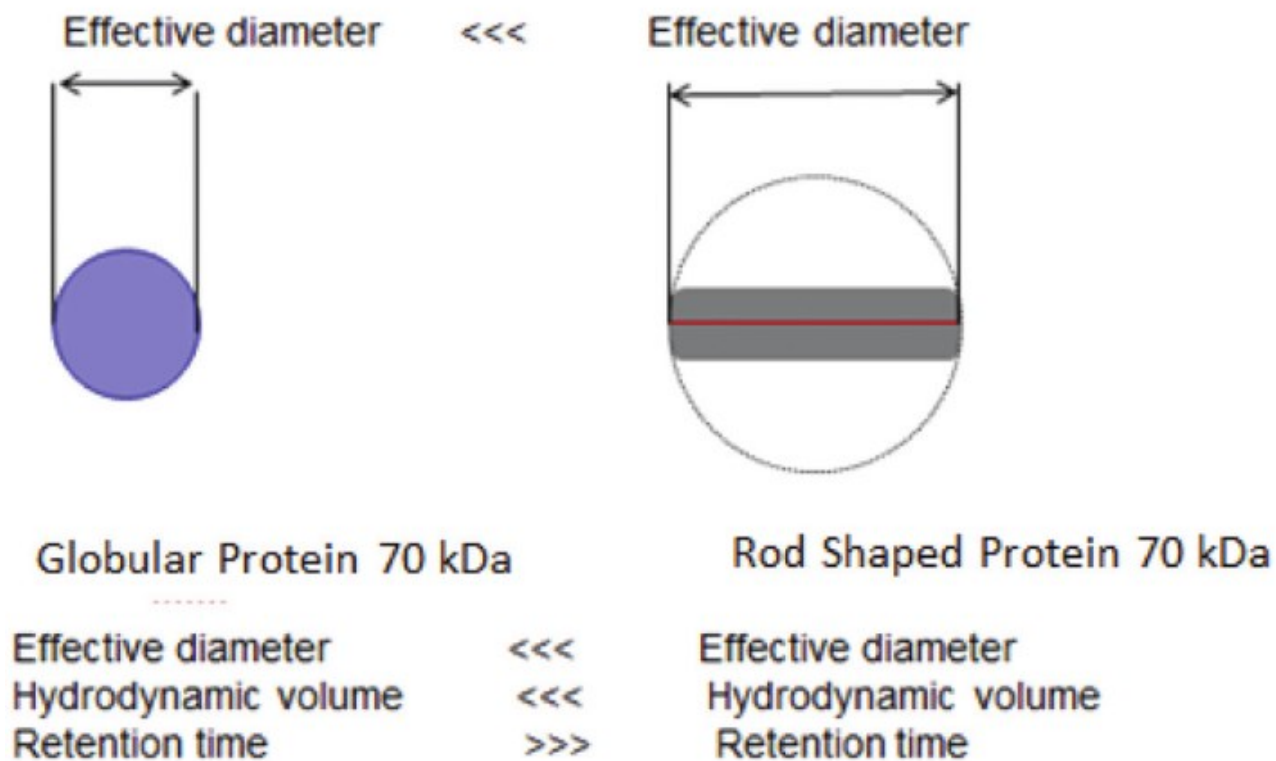


Figure 11.7: Representation of hydrodynamic volume

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



Comparison of globular and rod-shaped proteins.

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 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)

CROMATOGRAFIA DI ESCLUSIONE DIMENSIONALE

Tipi di colonne



A SECONDA DELLA PRESSIONE APPLICATA ALLA COLONNA:

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

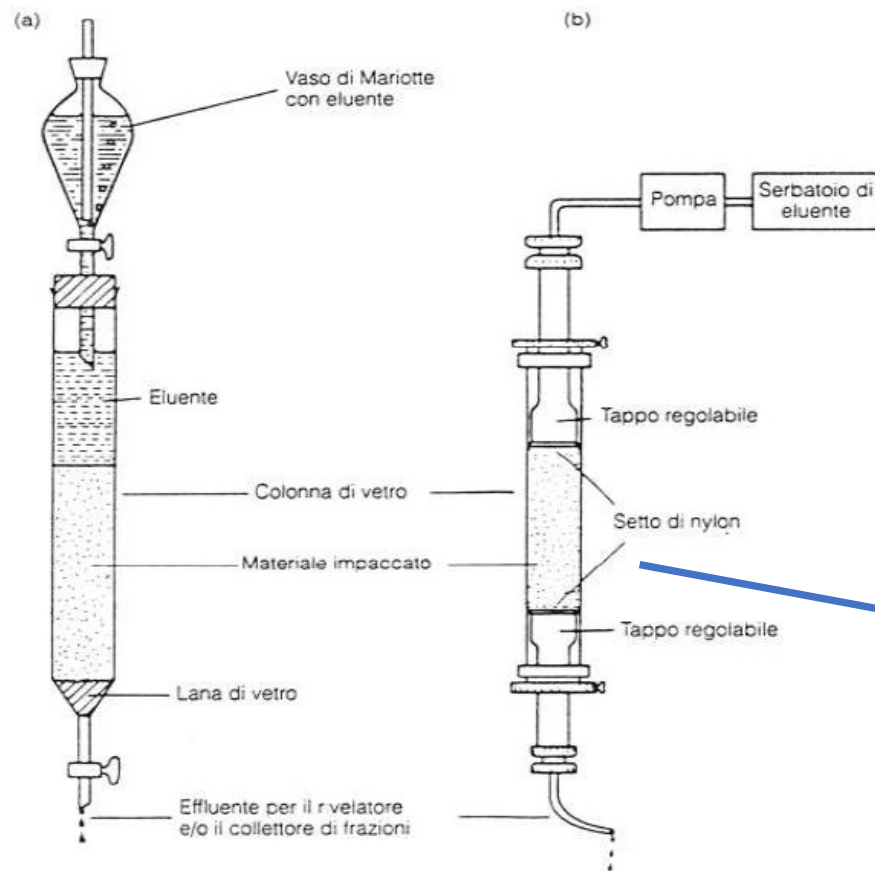
Cromatografia liquida a **media pressione (MPLC)** con pressioni tra 6 e 50 bar

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

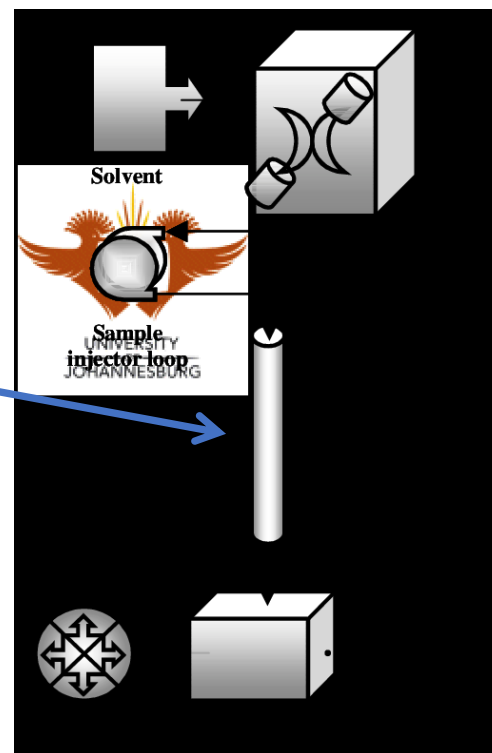
Diverse condizioni. Cambia

- resina
- colonna
- Eluizione (gravità o con pompe)
- strumentazione

APPARATO PER CROMATOGRAFIA SU COLONNA



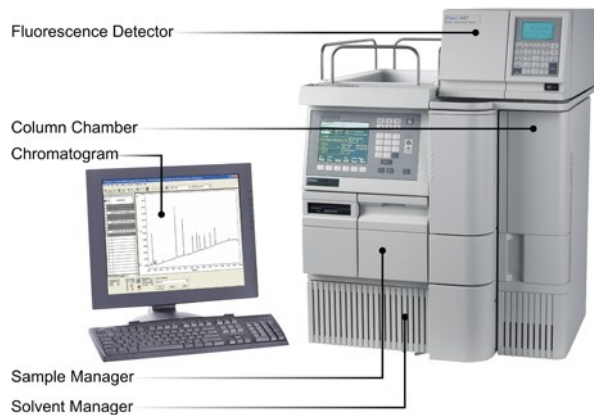
A valle della colonna:
rivelatore,
registratore,
collettore di frazioni



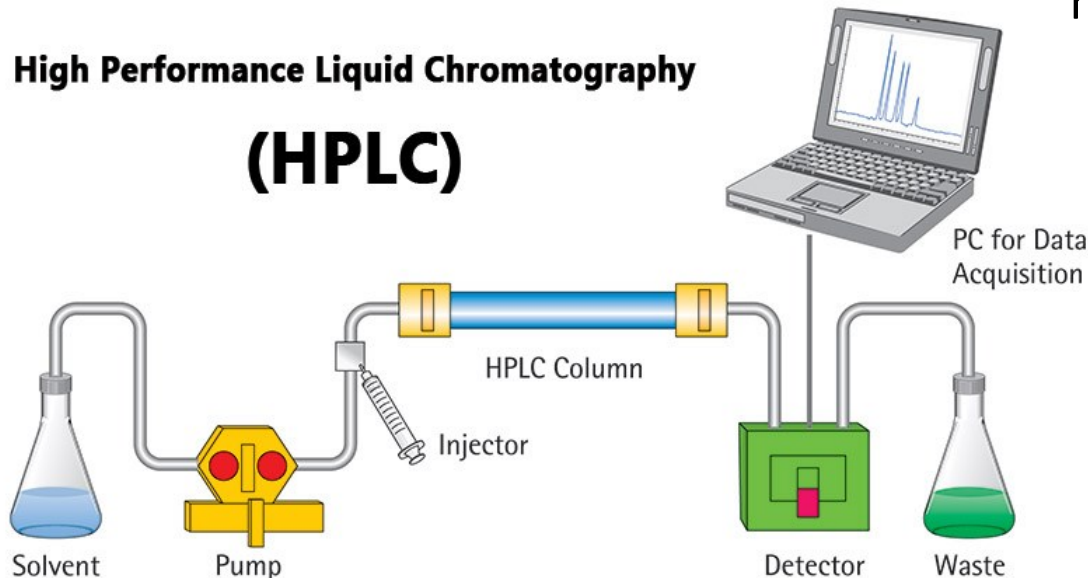
STRUMENTAZIONE PER HPLC

Un cromatografo HPLC è costituito dalle seguenti parti:

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



High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

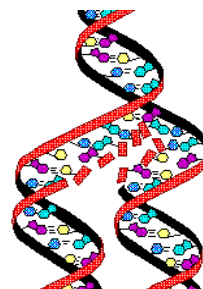


HPLC applications



Chemical

polystyrenes
dyes
phthalates



Bioscience

proteins
peptides
nucleotides



Pharmaceuticals

tetracyclines
corticosteroids
antidepressants
barbiturates



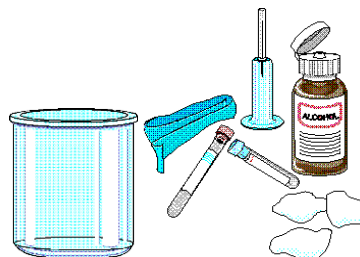
Consumer Products

lipids
antioxidants
sugars



Environmental

polyaromatic hydrocarbons
Inorganic ions
herbicides



Clinical

amino acids
vitamins
homocysteine

