

Cromatografia Liquida (LC)



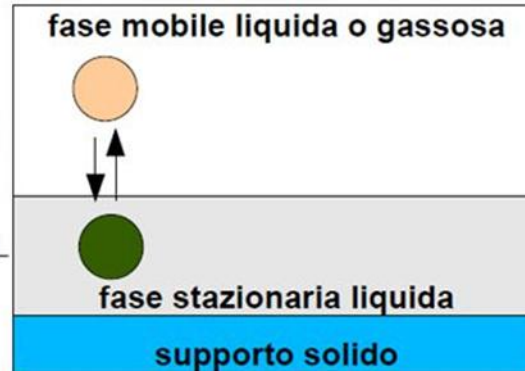
la fase eluente è un liquido

Nella **Liquido-Liquido (LLC) o di ripartizione**, la fase stazionaria è un liquido, immiscibile con la fase mobile, che impregna un supporto solido inerte; questo tipo di cromatografia è basato sulla diversa **ripartizione** di due o più soluti fra le due fasi liquide.

2) Ripartizione

La fase stazionaria è un liquido, in cui si verifica una vera e propria solubilizzazione delle sostanze da analizzare. Esse pertanto si ripartiscono fra le due fasi (immiscibili tra loro) e la costante K prende il nome di coefficiente di ripartizione e la legge $K = C_s / C_m$ legge di Nernst.

Se la fase mobile è un gas si parla di cromatografia gas-liquido (GLC), se invece è un liquido, di cromatografia liquido-liquido (LLC).

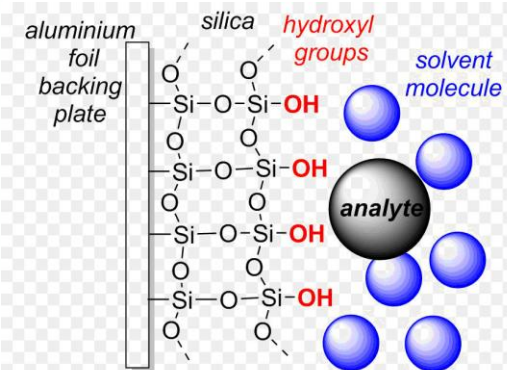
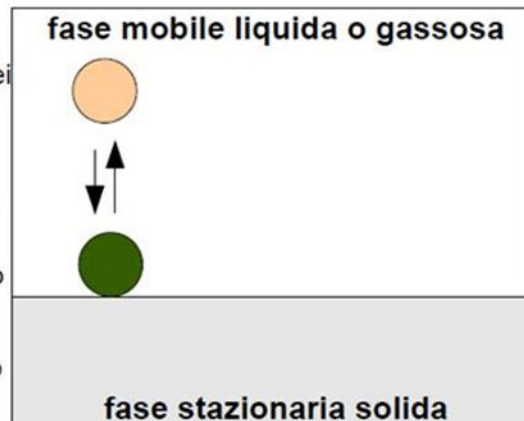


Nella **Liquido-Solido (LSC) o di adsorbimento**, la fase stazionaria è un materiale solido costituito da particelle con grande area superficiale: in questo caso il solido non è un semplice supporto inerte, ma è in grado di **adsorbire** superficialmente i soluti da separare. Il meccanismo di separazione è quindi determinato dalla diversa affinità dei soluti per la fase solida. Come materiali solidi adsorbenti si usano generalmente gel di silice, allumina, carbone attivo.

1) Adsorbimento

La fase stazionaria è un solido sulla cui superficie si trovano dei siti attivi in grado di stabilire legami secondari (dipolo-dipolo, ponte di idrogeno, Van der Waals) con le diverse molecole della miscela da risolvere (separare). Se la fase mobile è un liquido si parla di cromatografia liquido-solido (LSC), se invece è un gas, di cromatografia gas-solido (GSC).

In genere, le molecole che più facilmente vengono fissate sono quelle che presentano gruppi polari, anche se la natura dell'adsorbente influisce sul fenomeno. L'aumento di temperatura agisce negativamente sull'adsorbimento in quanto provoca una maggior agitazione termica.



Nella cromatografia a **Scambio-Ionico (IEC)**, la fase stazionaria è costituita da una resina a scambio ionico, ossia un supporto organico al quale sono legati dei gruppi ionici o ionizzabili (ad esempio $-\text{SO}_3^-$, $-\text{COO}^-$, $-\text{NR}_3^+$). I gruppi ionici della resina trattengono per mezzo di interazioni elettrostatiche, controioni di carica opposta che possono essere scambiati con gli ioni presenti nella fase mobile. Il meccanismo di separazione è basato perciò sulla diversa affinità che i diversi soluti (ionici) presentano nei confronti dei gruppi attivi della resina.

Nella cromatografia di **Esclusione (SEC)**, la fase stazionaria è costituita da materiale poroso, avente i pori delle dimensioni delle molecole da separare (ad esempio setacci molecolari inorganici, tipo zeoliti, oppure polimeri organici di porosità controllata). Il meccanismo di separazione è determinato esclusivamente dalle dimensioni dei soluti: le molecole più grandi si muovono velocemente lungo la fase stazionaria, mentre quelle più piccole sono più trattenute perché penetrano all'interno dei pori della fase stazionaria.

Nella cromatografia **per affinità** si basa sulle interazioni che si formano tra una sostanza ed il relativo ligando.

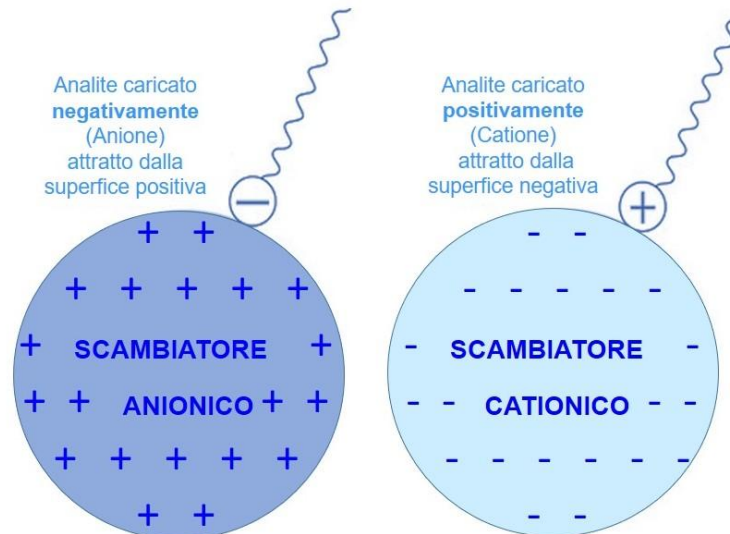
CROMATOGRAFIA a SCAMBIO IONICO

Sfrutta l'interazione elettrostatica tra molecole di segno opposto

Separa miscele di aminoacidi e proteine: possiedono gruppi ionizzabili al variare del pH in cui si trovano

1) Cromatografia a scambio anionico

2) Cromatografia a scambio cationico



CROMATOGRAFIA a SCAMBIO IONICO

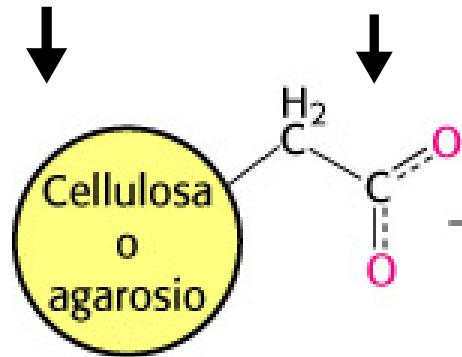
Cromatografia a scambio cationico



Scambiatore di cationi

FASE STAZIONARIA:
MATRICE + GRUPPO FUNZIONALE

carica
negativamente



Na^+ controione

Gruppo
carbrossimetilico (CM)
(forma ionizzata)

Attenzione:

Scambiatore di cationi: scambia cationi

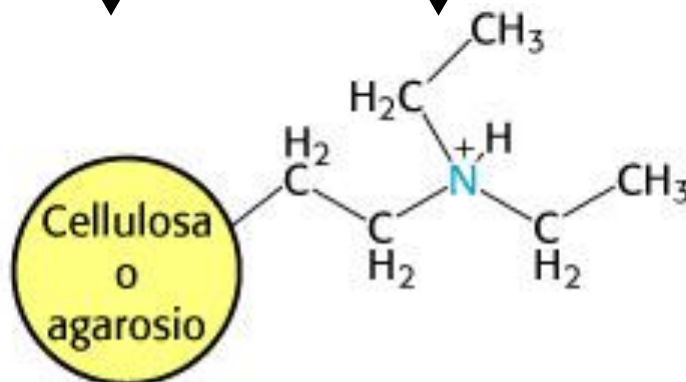
CROMATOGRAFIA a SCAMBIO IONICO

Cromatografia a scambio anionico



Scambiatore di anioni

FASE STAZIONARIA:
MATRICE + GRUPPO FUNZIONALE



carica
positivamente

Cl⁻ controione

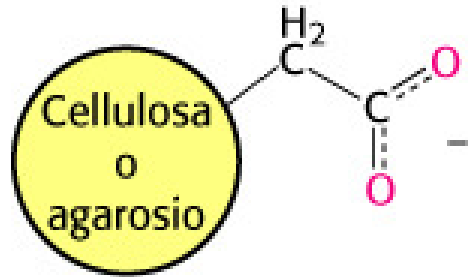
Gruppo
dietilamminoetilico (DEAE)
(forma protonata)

Attenzione:

Scambiatore di anioni: scambia anioni – carico positivamente

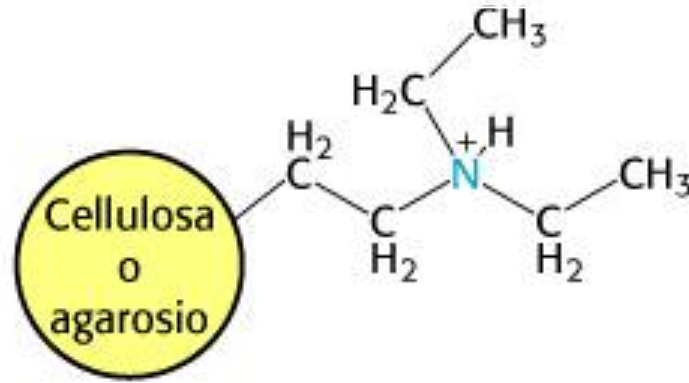
MATRICI USATE

Cromatografia a scambio cationico

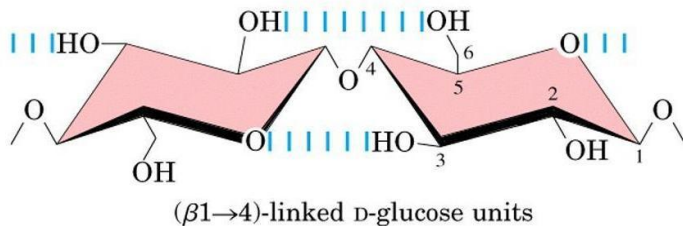


Gruppo carbossimetilico (CM)
(forma ionizzata)

Cromatografia a scambio anionico

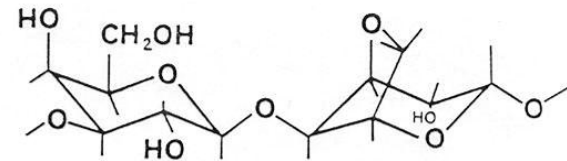


Gruppo dietilamminoetilico (DEAE)
(forma protonata)



cellulosa

polisaccaride lineare del glucosio
contenente legami glicosidici $\beta 1\rightarrow 4$.



agarosio

D-galattosio e 3,6-galattosio

FASI STAZIONARIE per CROMATOGRAFIA a SCAMBIO IONICO:

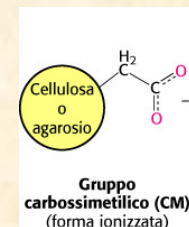


Scambiatori cationici deboli:

completamente ionizzati solo a determinati valori di pH

acidi deboli **Gruppo carbossimetilico (CM)** $-\text{CH}_2\text{COO}^-$ $\text{pK}_a = 5.0$

Utilizzabili in un range di pH più ristretto



Scambiatori cationici forti:

completamente ionizzati a tutti i valori di pH $\text{pK}_a < 1$

acidi forti **Gruppo solfonico** $-\text{SO}_3^-$

Utilizzabili in un range di pH più ampio

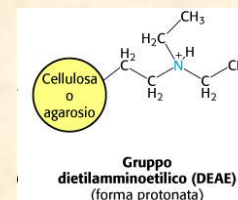
FASI STAZIONARIE per CROMATOGRAFIA a SCAMBIO IONICO:

Scambiatori anionici deboli:

completamente ionizzati solo a determinati valori di pH

▪ basi deboli Gruppo dietilaminoetilico **DEAE** $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$

Utilizzabili in un range di pH più ristretto



pKa = 9.0

Scambiatori anionici forti:

completamente ionizzati a tutti i valori di pH

basi forti Gruppo trimetil ammino metilico $\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$

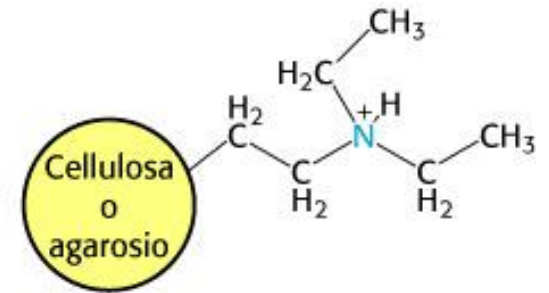
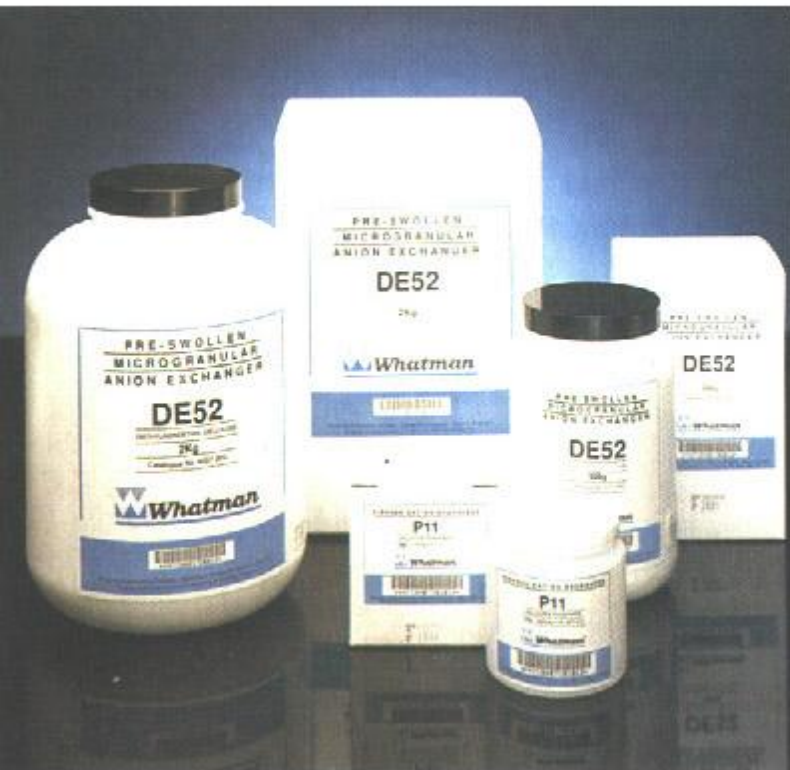
pKa > 13

Utilizzabili in un range di pH più ampio

TABELLA 5.2 ►►► PRINCIPALI FASI STAZIONARIE UTILIZZATE NELLA CROMATOGRAFIA A SCAMBIO IONICO

	Matrici	Gruppi funzionali
Scambiatore cationico debole	Agarosio Cellulosa Destrano Poliacrilato	$-\text{COO}^-$ $-\text{CH}_2\text{COO}^-$ Carbossile Carbossimetile
Scambiatore cationico forte	Cellulosa Destrano Polistirene	$-\text{SO}_3^-$ $-\text{CH}_2\text{SO}_3^-$ $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-$ Zolfo Sulfometile Sulfopropile
Scambiatore anionico debole	Agarosio Cellulosa Destrano Polistirene	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_3^+$ $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}^+(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$ Amminoetile Dietilamminoetile
Scambiatore anionico forte	Cellulosa Destrano Polistirene	$-\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$ Trimetilamminometile Trietilamminometile $-\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_2$ $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ Dimetil-2-idrossietilamminometile $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$ $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)$ OH Dimetil-2-idrossipropilamminoetile

DEAE



**Gruppo
dietilamminoetilico (DEAE)**
(forma protonata)

SCELTA DEL TIPO DI SCAMBIATORE DA UTILIZZARE



DIPENDE DAL PUNTO ISOELETTRICO (pI) DELLA PROTEINA



pI

pH superiore al pI=
PROTEINA deprotonata=
carica negativamente



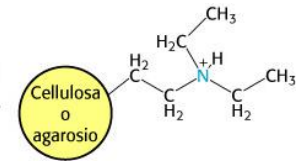
pH inferiore al pI=
PROTEINA protonata=
carica positivamente

Scambiatori anionico



PROTEINA carica negativamente

interagisce



Gruppo dietilamminoetilico (DEAE)
(forma protonata)

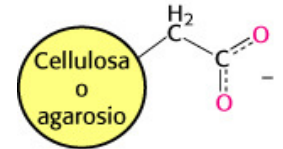
pI

Ma questo dipende dal pH!!!



PROTEINA carica positivamente

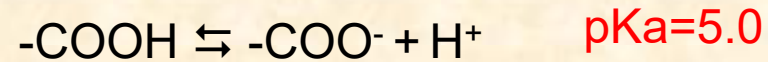
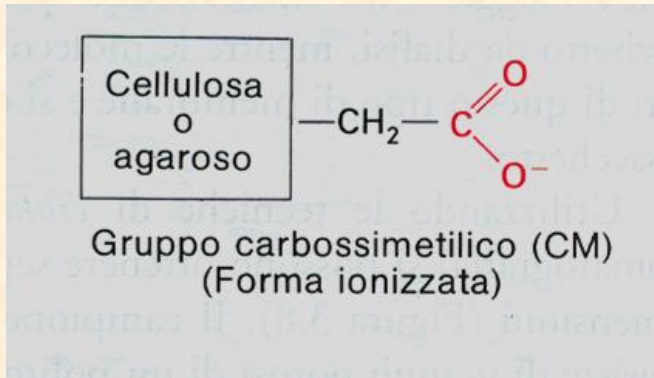
interagisce



Gruppo carbossimetilico (CM)
(forma ionizzata)

Scambiatore cationico

p.es. CM-cellulosa: carbossimetil cellulosa



$$\text{pH} = \text{pKa} + \log \frac{[-\text{COO}^-]}{[-\text{COOH}]}$$

Equazione di Henderson-Hasselbach

A quali valori di pH il gruppo carbossilico è ionizzato?

Se $\text{pH} = \text{pKa} = 5.0$

50% dei gruppi deprotonati
50% gruppi sono protonati

Se si utilizza un $\text{pH} > 1$ unità rispetto al pKa $\text{pH} 6.0 \rightarrow \% \text{ deprotonaz} = 90\%$

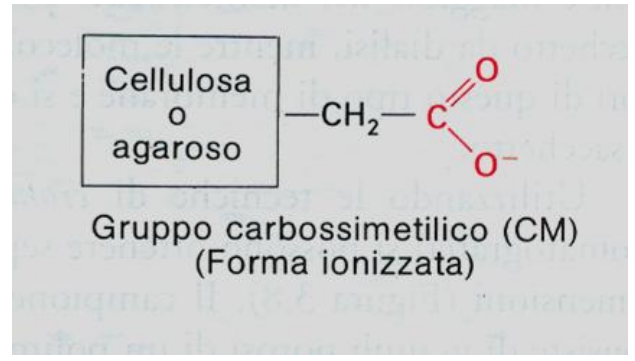
$$\begin{aligned} \text{pH} = 6 &= 5 + \text{Log} [\text{COO}^-]/[\text{COOH}] \rightarrow \text{Log} [\text{COO}^-]/[\text{COOH}] = 1 \\ &\rightarrow [\text{COO}^-]/[\text{COOH}] = 10^1 = 10/1 \end{aligned}$$

a pH 6 avremo il 10% di COOH e il 90% COO-

Se si utilizza un $\text{pH} > 2$ unità rispetto al pKa $\text{pH} 7.0 \rightarrow \% \text{ deprotonaz} = 99\%$

CROMATOGRAFIA a SCAMBIO CATIONICO con SCAMBIATORE DEBOLE

p.es. CM-cellulosa: carbossimetil cellulosa



A quali valori di pH le Proteine sono cariche (+)
???

pH della fase mobile < pI



Il pI delle proteine è mediamente 7

$$\text{pH} = \text{pKa} + \log \frac{[-\text{COO}^-]}{[-\text{COOH}]} \quad \text{pKa}=5.0$$

- A pH= 6.0 < deprotonazione (90%)
- A pH=7 > deprotonazione (99%)

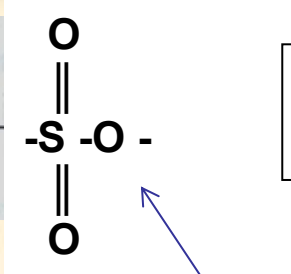
- a pH 6.0 un maggior numero di proteine (++)
- a pH 7.0 un minor numero di proteine (+)

**Si sceglie un pH di lavoro della CM-cellulosa
1 unità pH > pKa**

pH=> 6.0

CROMATOGRAFIA a SCAMBIO CATIONICO con SCAMBIATORE FORTE

Cellulosa
o
agaroso



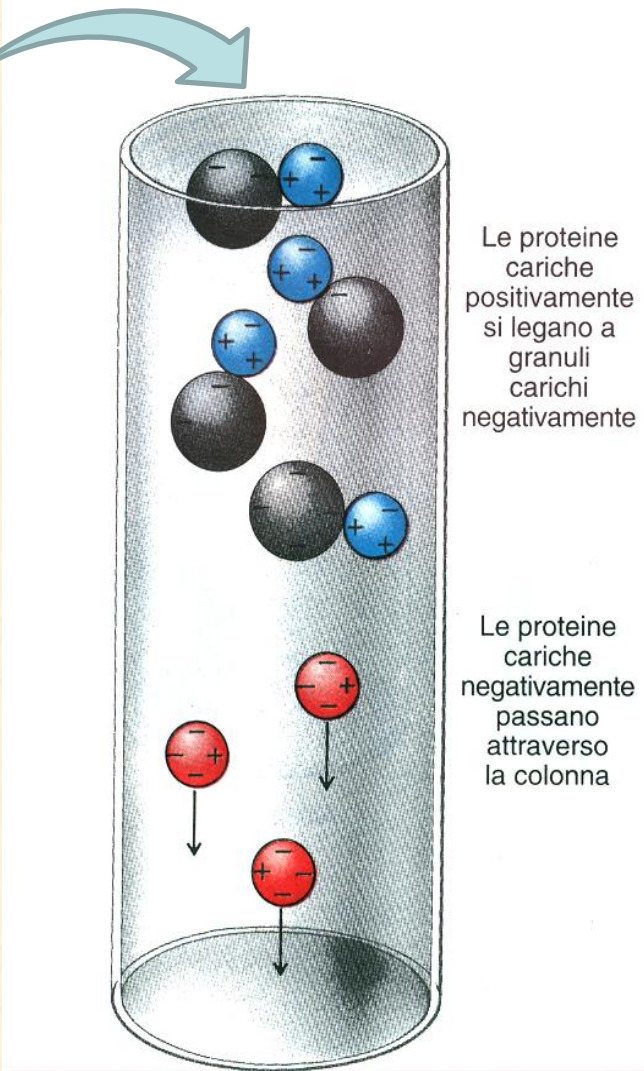
pKa < 1
Sempre ionizzato a
qualsunque valore di pH

Gruppo solfonico $-\text{SO}_3^-$

Proteine (cariche +)

FASE MOBILE=
pH < pI delle proteine

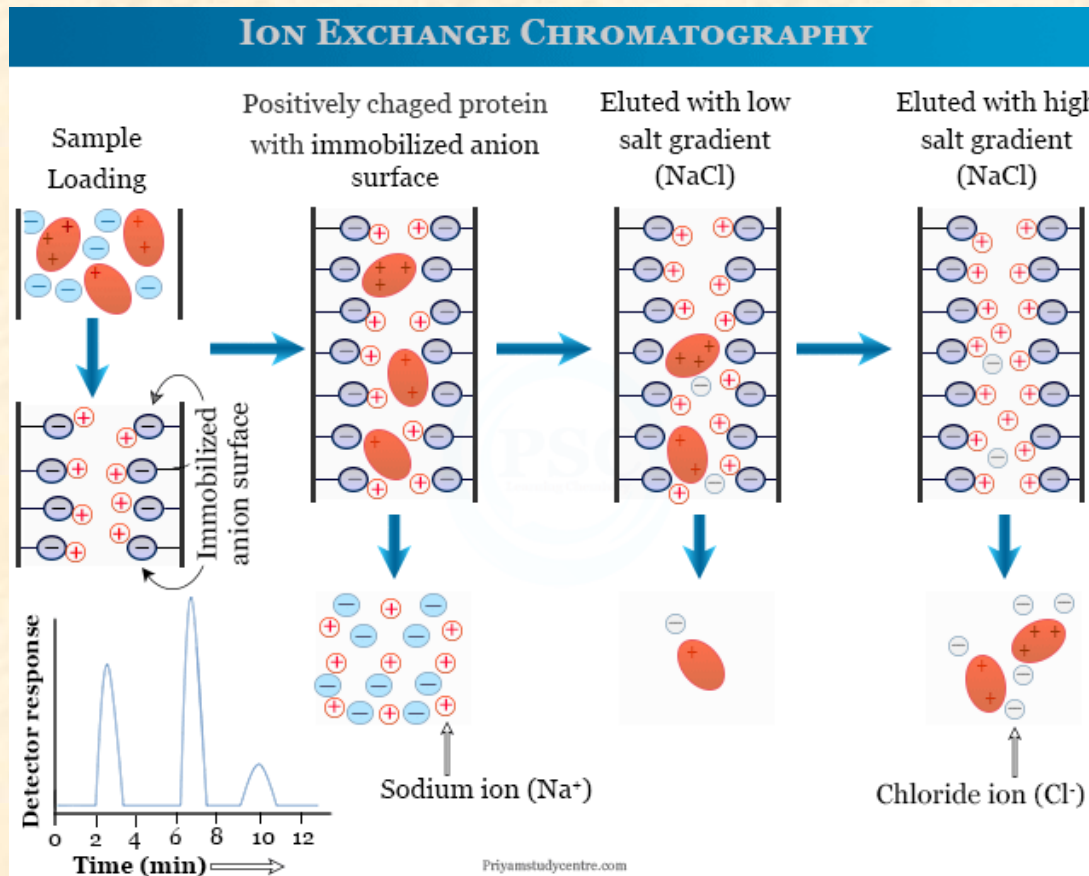
ma non troppo basso
per non denaturarle!!



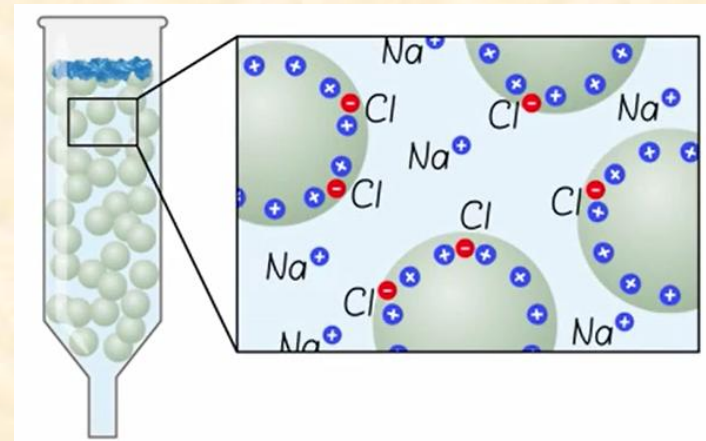
Si sceglie un pH di lavoro della CM-cellulosa 1 unità pH > pKa
Es: pH 6

Eluizione NON ISOCRATICA (step o in gradiente)

- Variazione del pH : aumento del pH (perdita della carica +)
- Variazione della forza ionica (+ Na⁺Cl⁻): per aumento della [Na⁺] \gg controione



Eluizione NON ISOCRATICA (a step o in gradiente):
Aumento pH / Aumento della forza ionica



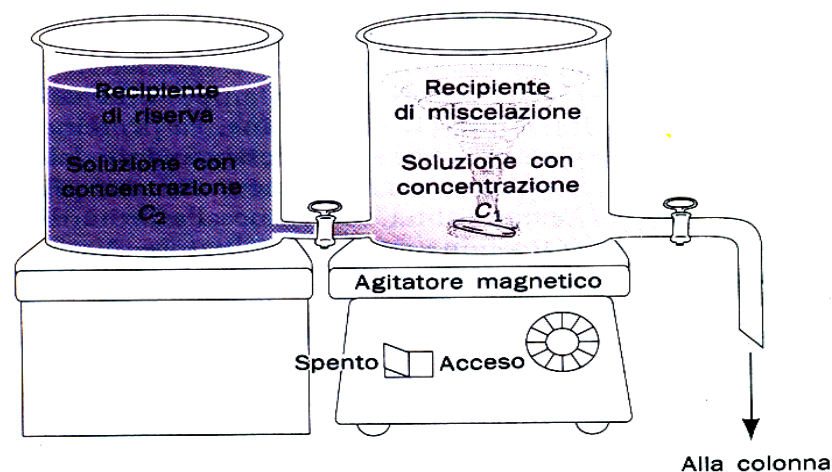
Pianificare la separazione delle seguenti proteine utilizzando una colonna cromatografica contenente lo scambiatore di cationi

CM-cellulosa

A quale valore di pH dobbiamo equilibrare la Fase stazionaria?

Stabilire la carica di ciascuna proteina nelle condizioni prescelte

	pl	carica
Emoglobina	7,1	
Citocromo c	10,6	
Fibrinogeno	5,0	
Ribonucleasi	7,8	
Lisozima	11,0	



In quali condizioni sperimentali possiamo eluire le proteine?

Ipotizzare il grafico di eluizione corrispondente

Scambiatore cationico

Fase mobile: Buffer pH 6

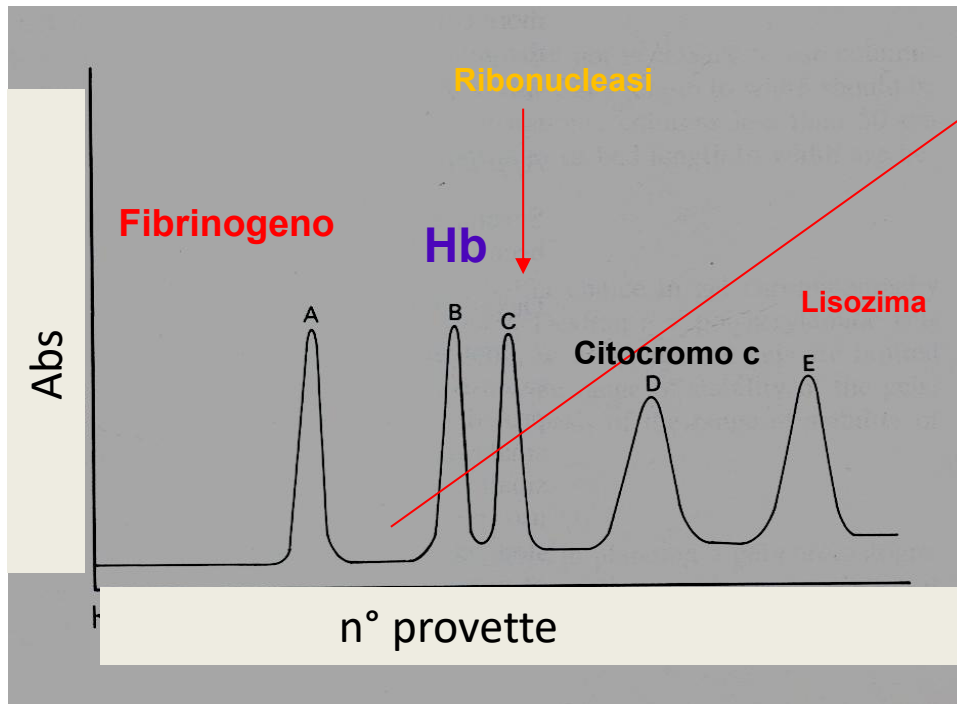
Stabilire la carica di ciascuna proteina nelle condizioni prescelte →

- Variazione del pH > aumento del pH
- Aumento della forza ionica

	pI	carica
Emoglobina	7,1	(+)
Citocromo c	10,6	(+++)
Fibrinogeno	5,0	(-)
Ribonucleasi	7,8	(++)
Lisozima	11,0	(++++)

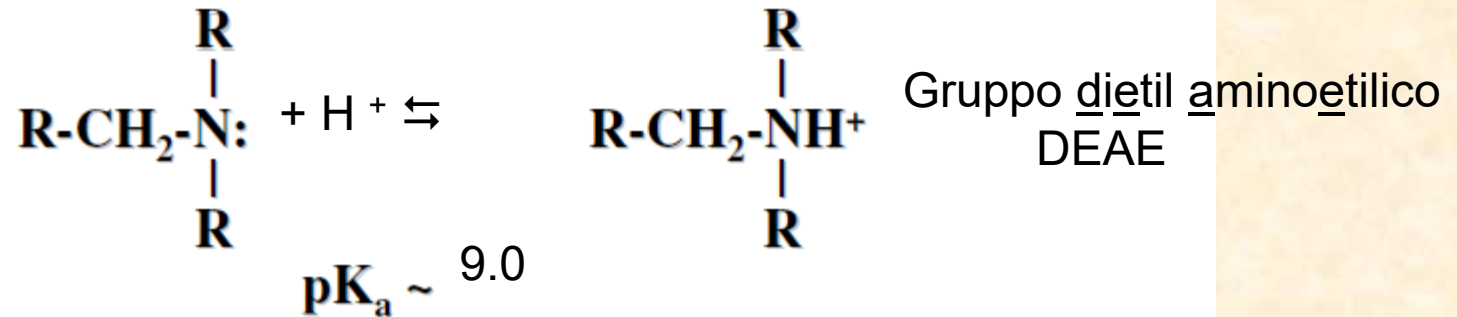
	pI	carica
Fibrinogeno	5,0	(-)

Verrà eluito senza legarsi alla resina

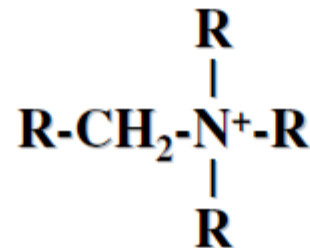


Scambiatori di anioni

Gruppo amminico terziario scambiatore debole di anioni



Ammina quaternaria scambiatore forte di anioni

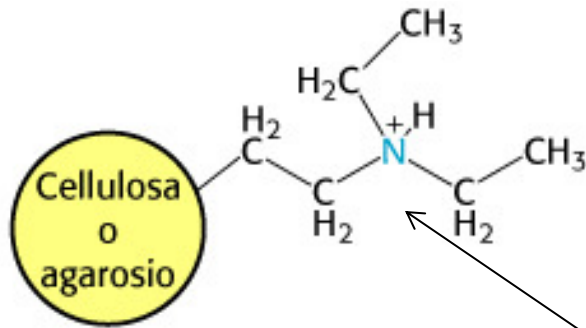


Gruppo trimetil amminometilico

$\text{pK}_a > 13$

Cromatografia a SCAMBIO ANIONICO

con **SCAMBIATORE DEBOLE**: ad esempio DEAE-cellulosa



$$\text{pKa} = 9.0$$

$$\text{pH} = \text{pKa} + \log \frac{[-\text{NH}_2]}{[-\text{NH}_3^+]}$$

Equazione di Henderson-Hasselbach

pH = pKa = pH 9.0 → 50% gruppi protonati
50% gruppi deprotonati

Se $\text{pH} < \text{pKa}$ aumenta la % protonazione

Cromatografia a SCAMBIO ANIONICO con SCAMBIATORE DEBOLE: ad esempio DEAE-cellulosa



$$\text{pH} = \text{pKa} + \log \frac{[-\text{NH}_2]}{[-\text{NH}_3^+]}$$

$$\text{pH} = \text{pKa} = \text{pH } 9.0$$

a pH 8 = 90% protonazione
a pH 7 = 99% protonazione



proteine (-)

Il pI delle proteine è mediamente 7

a pH 8.0 un maggior numero
di proteine (-)

a pH 7.0 un minor numero di
proteine (-)

pH di lavoro della DEAE-cellulosa 1 unità pH < pKa pH = 8.0

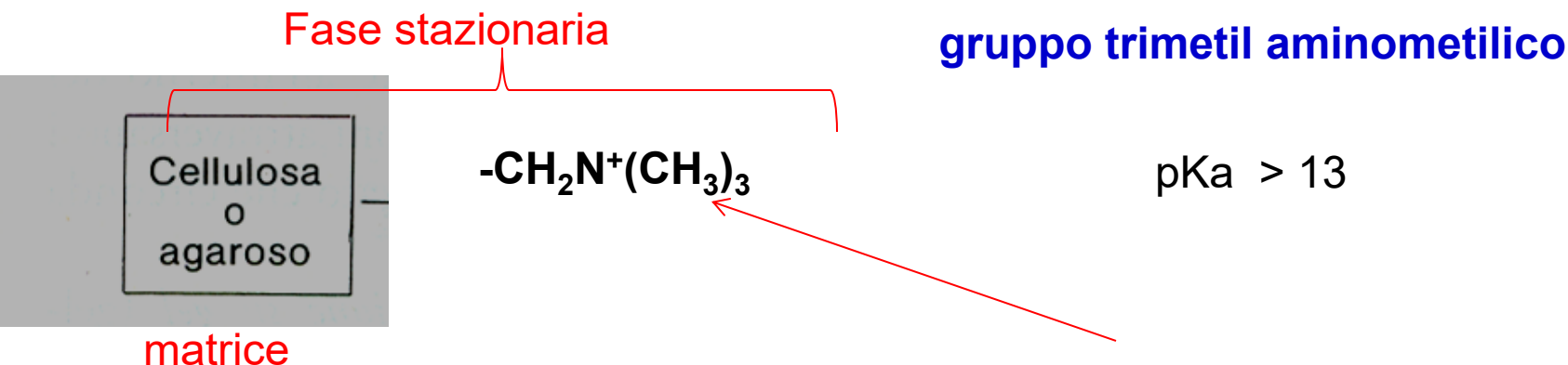
Eluizione (a step o in gradiente):

1) Diminuzione pH → perdita della carica –

2) Aumento forza ionica ($I = \frac{1}{2} \cdot c \cdot z^2$) → scambio per azione di massa

es: aumento della concentrazione di Na⁺Cl⁻

Cromatografia a scambio anionico con **SCAMBIATORE FORTE**



Fase stazionaria sempre carica (+) **proteine cariche (-)**

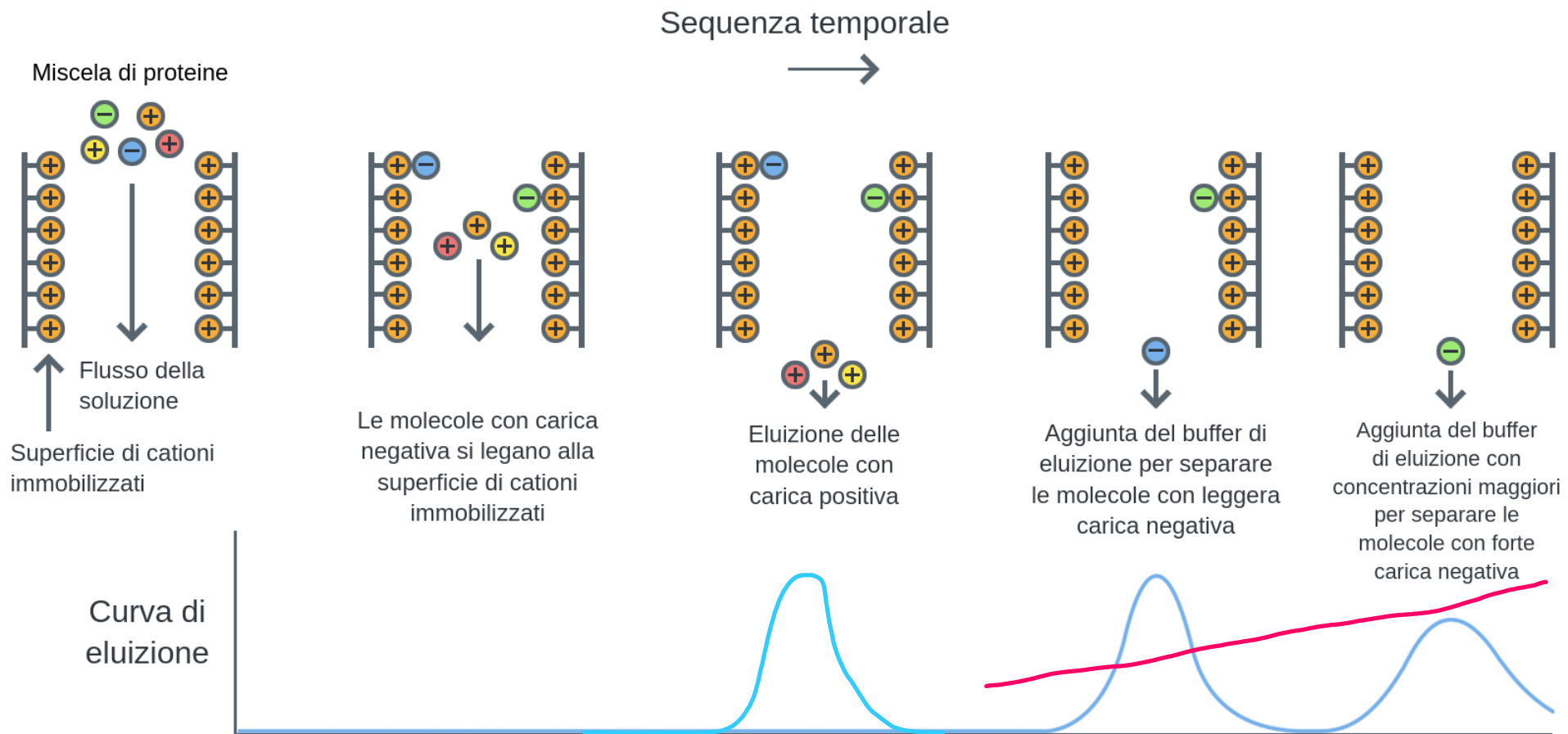
FASE MOBILE = Soluzione tampone a pH > pI delle proteine **ES: pH = 8**
a bassa forza ionica

Eluizione NON ISOCRATICA (a step o in gradiente):

•1) Diminuzione pH >>> perdita della carica da parte delle **proteine(+)**

•2) Aumento forza ionica >> scambio per azione di massa

Es: aumento della concentrazione di **Na⁺Cl⁻** per aumento della **[Cl⁻]** >> controione



Eluizione NON ISOCRATICA (a step o in gradiente):

- Diminuzione pH → perdita della carica (+)
- Aumento della forza ionica ($I = \frac{1}{2} \cdot c \cdot z^2$) + Na^+Cl^- → scambio x azione massa

Grafico di eluizione
Eluizione NON Isocratica

ELUIZIONE A STEP

- Aumento della forza ionica

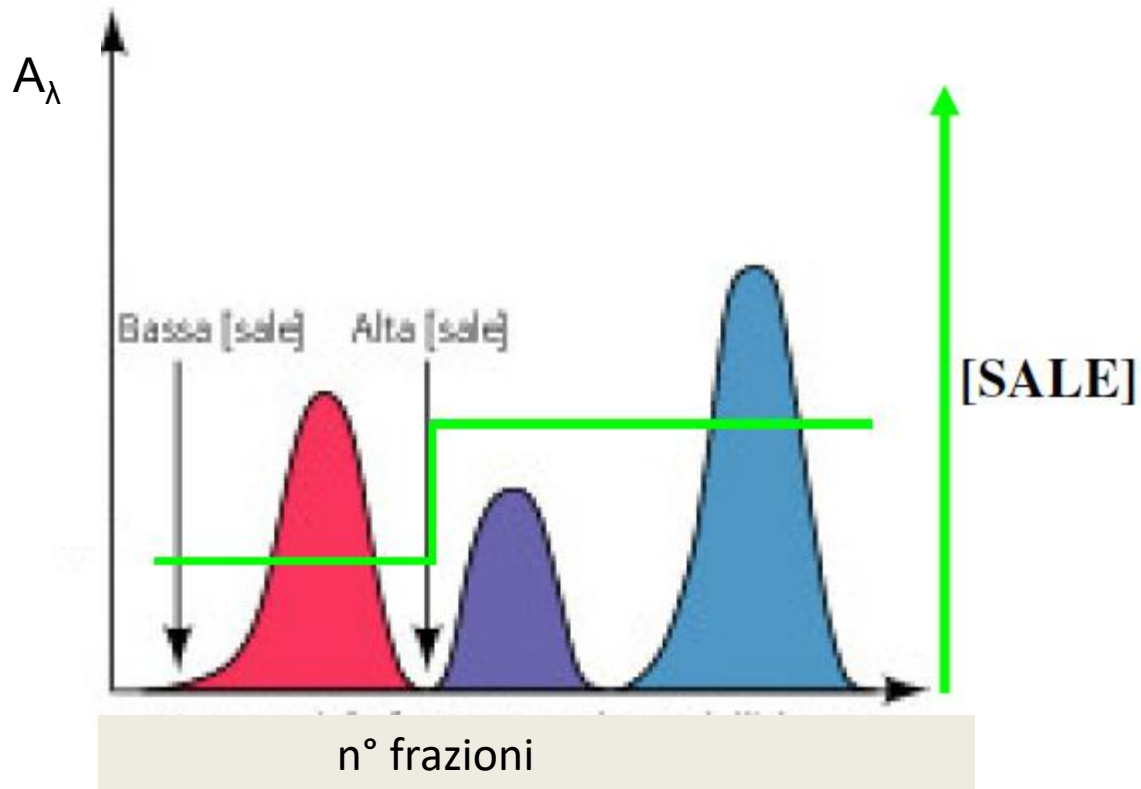
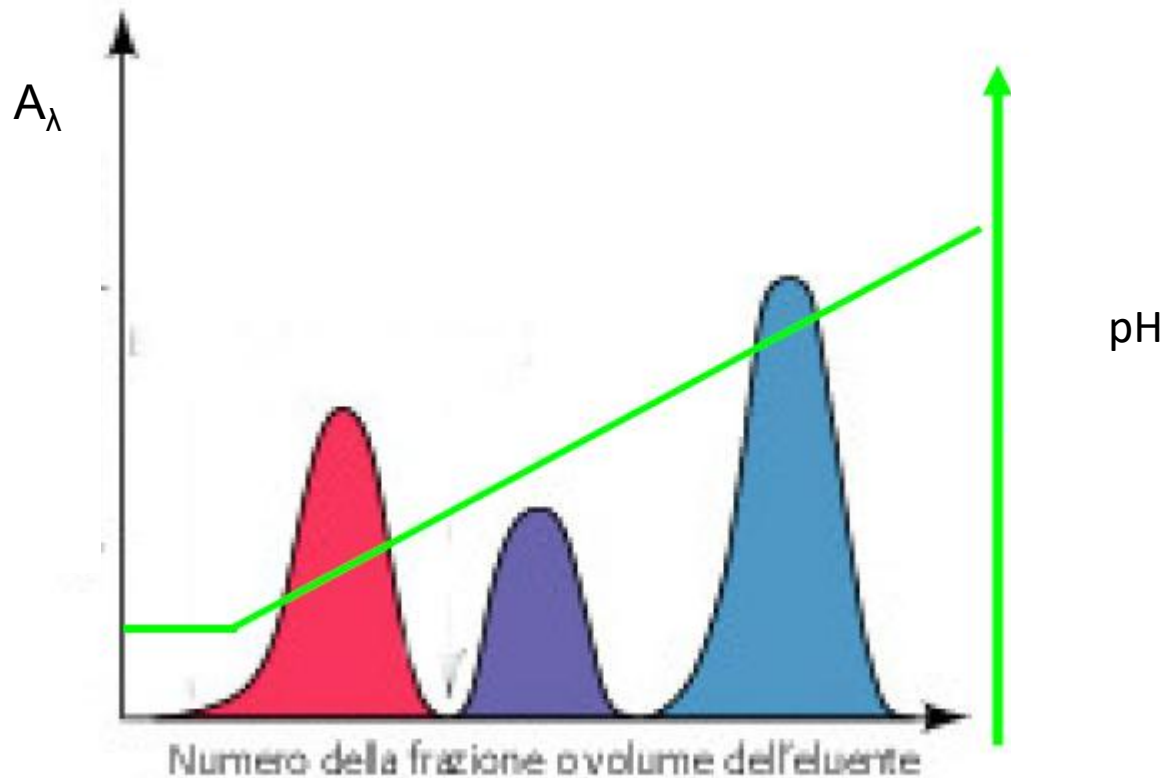


Grafico di eluizione
Eluizione NON Isocratica

- Aumento pH →
- perdita della carica (+)

ELUIZIONE IN GRADIENTE



Scegliere le condizioni sperimentali più opportune per purificare le seguenti proteine a partire da una miscela contenente:

	pI
Emoglobina	7.1
Albumina	4.9
Ribonucleasi	7.8
Lisozima	11.0
Insulina	5.4
Citocromo c	10.6

Possiamo utilizzare uno scambiatore debole?

Condizionamento della colonna:
pH con tutti i valori > 6 per la CM

(pKa =5)

pH con tutti i valori <8 per la DEAE

(pKa =9)

In che condizioni sperimentali?

A pH =6 hanno carica positiva le proteine con pI>7:

BASICHE

A pH =8 hanno carica negativa le proteine con

pI<7: ACIDE

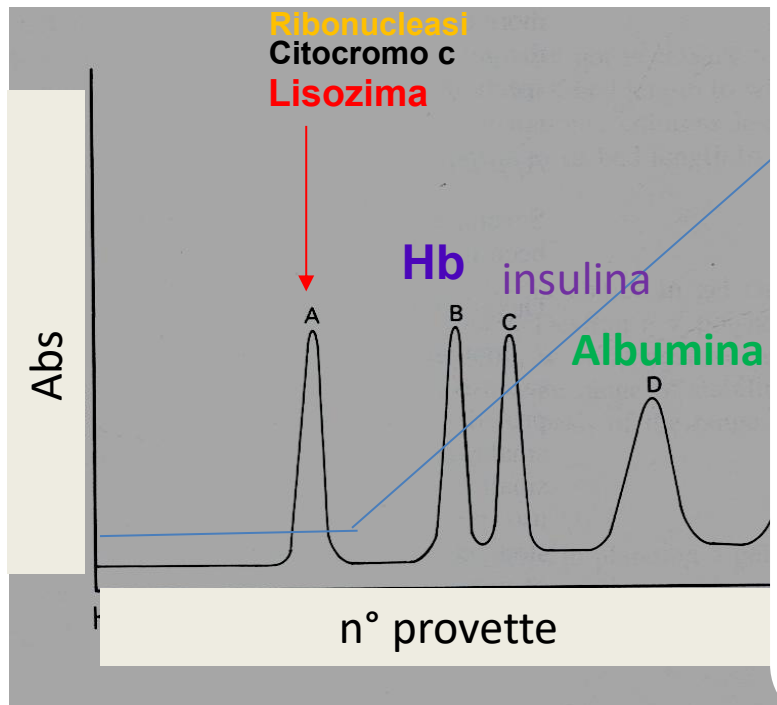
DEAE: posso equilibrare la colonna a pH=7

CM: posso equilibrare la colonna a pH =6

Ipotizzare il grafico di eluizione corrispondente

	pl	
Emoglobina	7.1	(zero)
Albumina	4.9	(--)
Ribonucleasi	7.8	(+)
Liozima	11.0	(+++)
Insulina	5.4	(--)
Citocromo c	10.6	(+++)

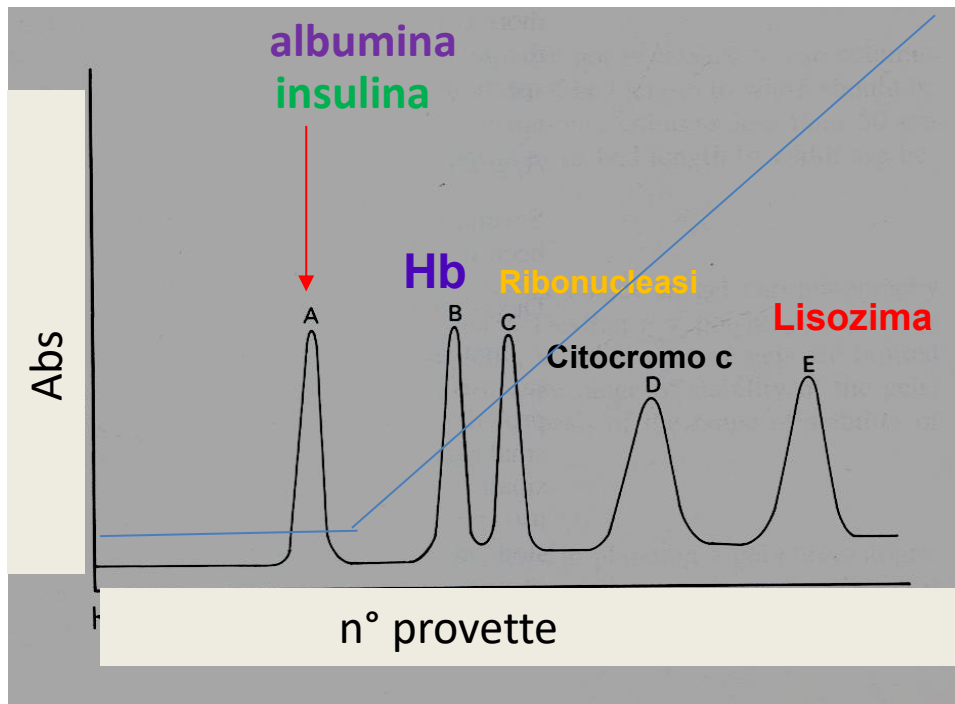
DEAE: posso equilibrare la colonna a pH=7
 Per avere le proteine cariche negativamente
 dovrei avere il pH>pl:



ELUIZIONE: diminuzione del pH/ aumento forza ionica

	pI	
Emoglobina	7.1	(+)
Albumina	4.9	(-)
Ribonucleasi	7.8	(++)
Liozima	11.0	(+++)
Insulina	5.4	(--)
Citocromo c	10.6	(+++)

CM: posso equilibrare la colonna a pH= 6
 Per avere le proteine cariche positivamente
 dovrei avere il $pH < pI$



ELUIZIONE: aumento del pH/ aumento della forza ionica

Cromatografia a scambio ionico

• VANTAGGI

- Possono essere utilizzati grandi volumi di campione e grandi quantità di proteine (1-5 g proteina per 100 ml di Fase Stazionaria),
- Alta flessibilità nelle condizioni sperimentali (pH, I)

• SVANTAGGI

- Separa solo molecole cariche
- Eluizione NON Isocratica (variazioni di pH o forza ionica)
Prima della cromatografia può essere necessario eliminare i sali presenti o modificare il pH.