

PRINCIPALI COMPONENTI DI UN SISTEMA CROMATOGRAFICO

-UNO O PIU' SERBATOI PER LE FASI MOBILI

-UN SISTEMA DI CARICAMENTO DEL CAMPIONE

-UNA CAMERA DI MISCELAZIONE

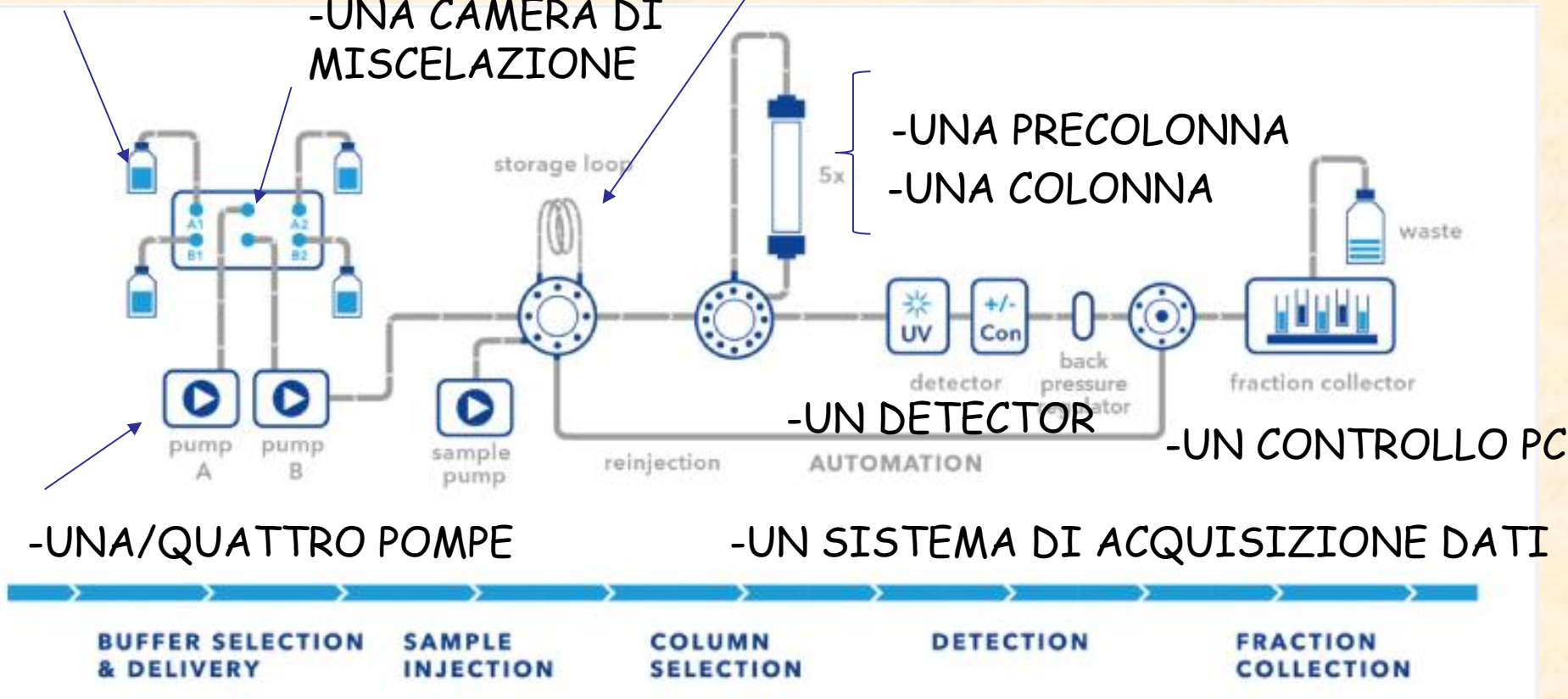
-UNA PRECOLONNA
-UNA COLONNA

-UN DETECTOR

-UN CONTROLLO PC

-UNA/QUATTRO POMPE

-UN SISTEMA DI ACQUISIZIONE DATI



FPLC

Fast Pressure Liquid Chromatography

- Valori di pressione: 0-600 psi
- Flusso: 1-8 mL/min

Si utilizzano buffer acquosi e salini
IMPORTANTE:
perchè mantengono le caratteristiche
strutturali e funzionali delle proteine



- ➔ Iniettore
- ➔ Una o due pompe peristaltiche
- ➔ Rivelatore
(spettrofotometro,
fluorimetro,
rifrattometro,
conduttimetro)



(1 atm = 1 Bar = 14.7 psi)

Colonne FPLC:

Colonne per filtrazione di gel preimpaccate
Tricorn™ Superose™ 6 e Superose
1988.6€ - 2140.00€

Volume letto	24mL
Tampone	1M Acetic Acid, 8M Urea, 6M Guanidine Hydrochloride, 1% SDS, Organic Solvents, 0.5M NaOH (for cleaning in-place)
Diametro (sistema metrico) interno	10mm
Da utilizzare con (applicazione)	fractionation range of 5000 to 5,000,000
Altezza (sistema metrico)	300mm



HPLC = HIGH PRESSURE LIQUID CROMATOGRAPHY

HPLC = HIGH PERFORMANCE LIQUID CROMATOGRAPHY

Pressioni da 500 a 10000 psi

(1 atm = 1 Bar = 14.7 psi)

↓ **Diametro delle particelle della fase stazionaria (3-10 μm) anziché 150-200 μm**
(capaci di sopportare le pressioni elevate)

↑ **Superficie disponibile per la separazione** ↑ **Risoluzione del sistema**

↑ **Resistenza al flusso di fase mobile:**



HPLC Vantaggi

- **Rapidità e precisione in analisi quantitative**
 - ▀ Tipico tempo di analisi di 5 - 20 min.
 - ▀ Precisione (errore < 0,5 - 1%)
- **Analisi automatizzate**
 - ▀ Usando autocampionatori ed elaboratori di dati
- **Alta sensibilità**
 - ▀ Limite di rivelabilità (LOD) di ng a pg
- **Recupero del campione quantitativo**
 - ▀ Tecniche preparative da μg a g
- **Adatta a diversi tipi di campioni**
 - ▀ Può analizzare più del 60% di tutti i composti contro il 15% della GC

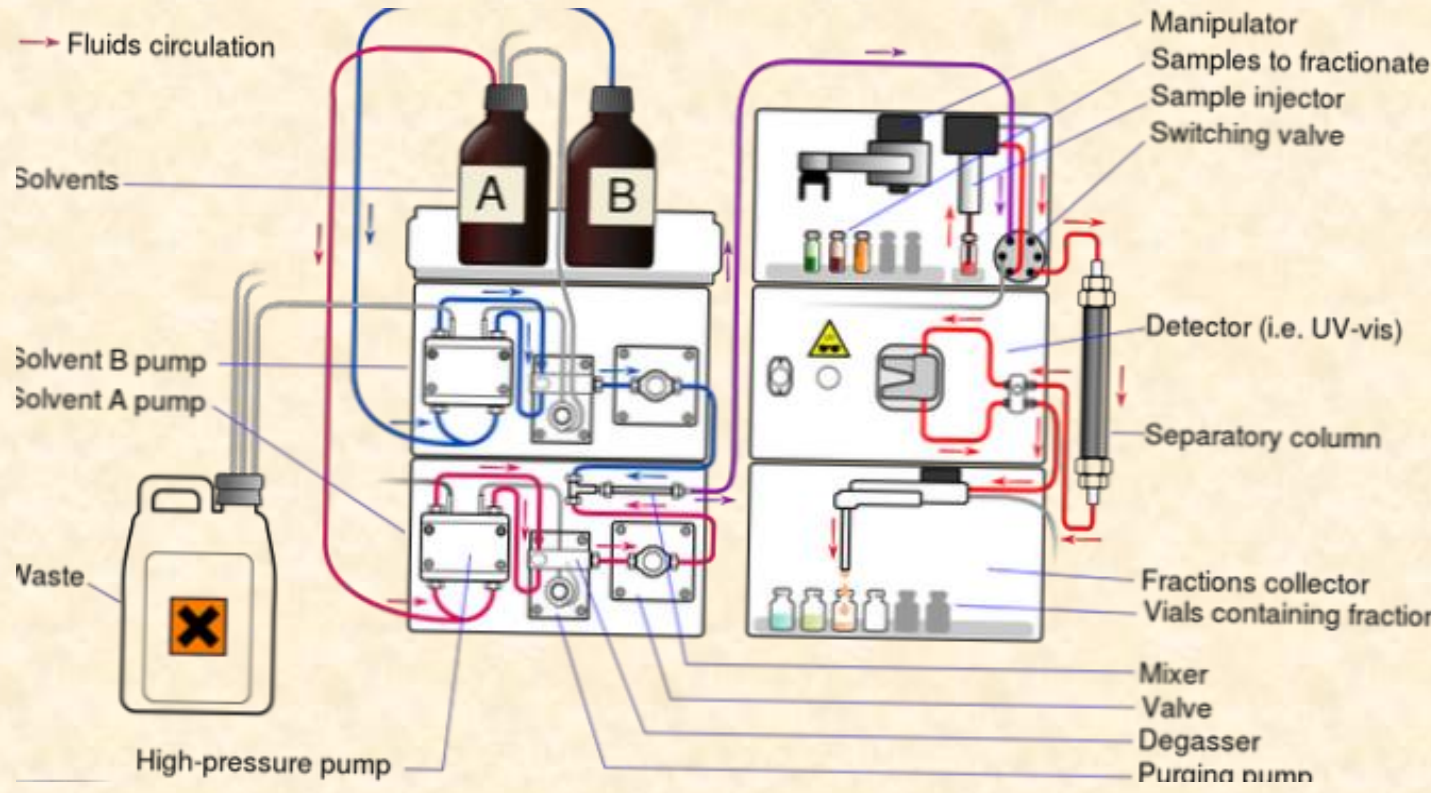
→ Pompe

- un flusso costante e riproducibile
- velocità di flusso da 1mL/min a 1μL/min
- capacità di resistere alla corrosione esercitata dai solventi delle fasi mobili

→ Colonna

→ Iniettore

→ Rivelatore



Colonne HPLC

Colonne in acciaio inossidabile
per resistere alle pressioni elevate (10000 psi)

Lunghezze variabili : 3-50 cm

- Diametro di 1-4 mm (o anche più piccole per le cromatografie analitiche)
- Diametro sino a 25 mm (preparative)



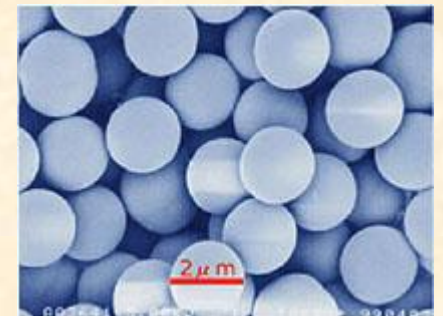
Precolonne

in testa alla colonna può essere montata
una piccola colonna dello stesso diametro, impaccata con la stessa FS

Per salvaguardare la colonna e trattenere
contaminanti dei solventi o del campione



Tubi di connessione: Acciaio Peek

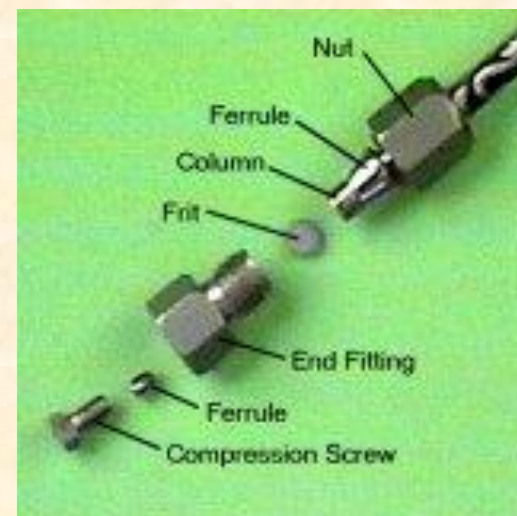


Colonne per HPLC

- Lunghezza di 20-50 cm

Diametro di 1 cm

Flussi di 1mL/min



Colonne capillari:
Diametro interno 100-500 μ m

Flusso 0.4-100 μ L/min

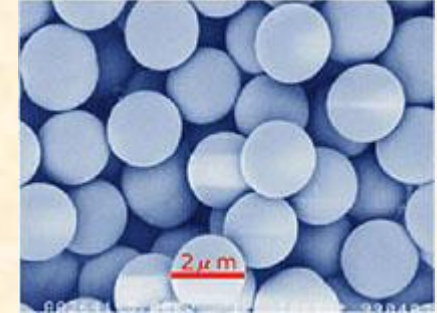
Colonne microbore:
3-5 cm lunghezza e
diametro di 1-2 mm



Tempi di eluizione molto
ridotti: 2-6 min

Pre-colonne :

La Fase stazionaria utilizzata non deve venire danneggiata dalle alte pressioni utilizzate: utilizzo di FS resistenti alle elevate pressioni.

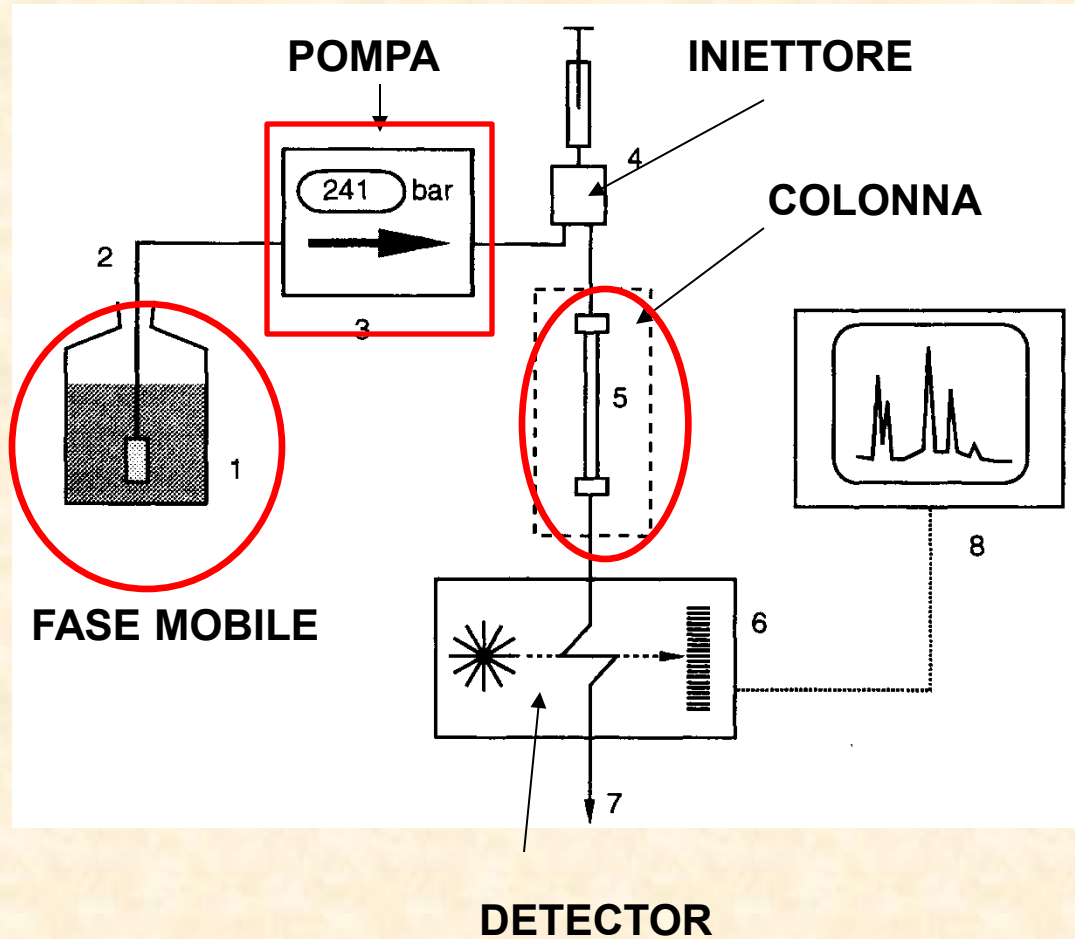


Particelle pellicolari: granuli sferici (non porosi) di vetro (30-40μm) ricoperti da uno strato poroso di silice, allumina o resine a scambio ionico

Particelle microporose: silice microporosa 5-15μm

La Fase stazionaria viene legata a gruppi funzionali a seconda del tipo di cromatografia

Sistema HPLC

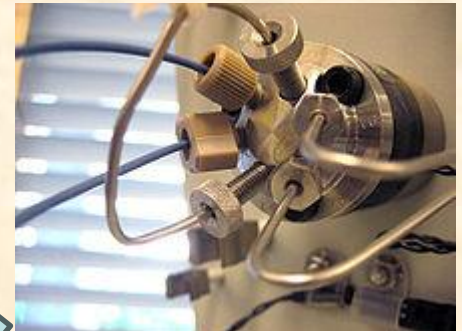
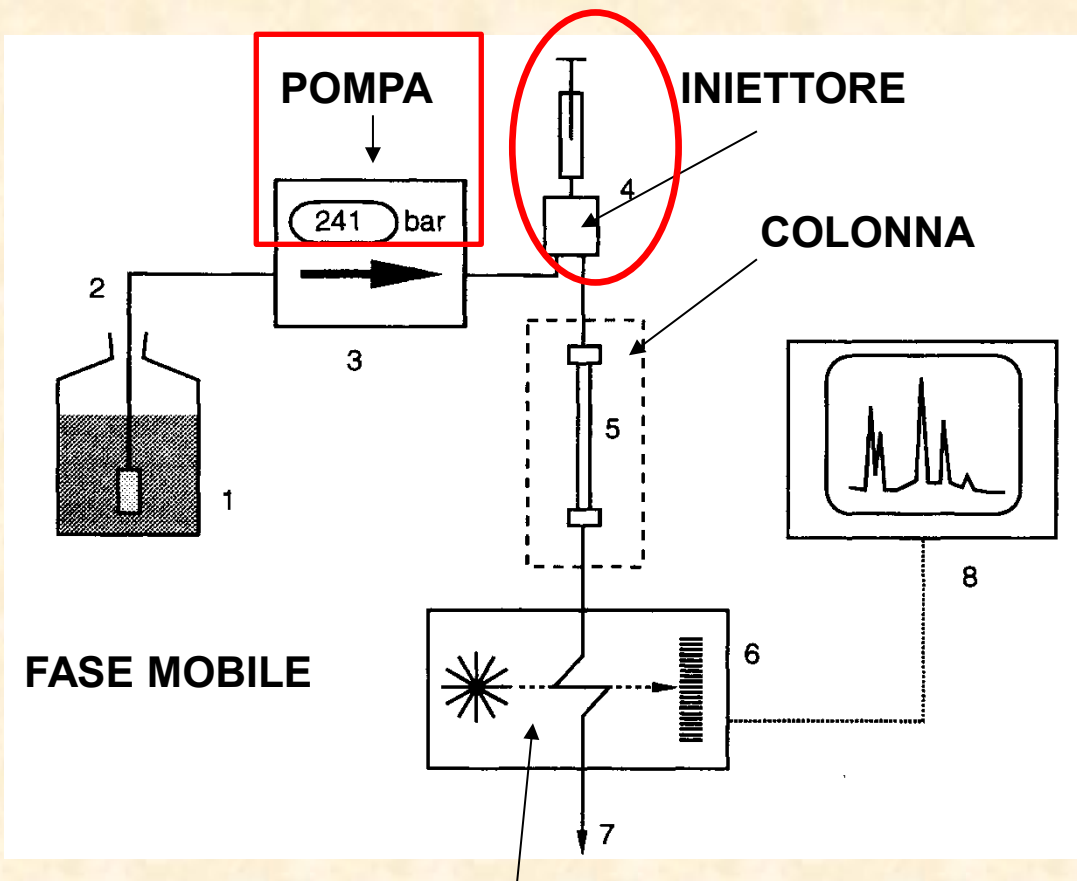


FASE MOBILE:

- Solventi ad elevato grado di purezza
- Filtrati (1-5 μm filtro)
- Degasati (p.es. flusso di Elio, vuoto, ultrasuoni)



INIEZIONE DEL CAMPIONE: Sistema HPLC



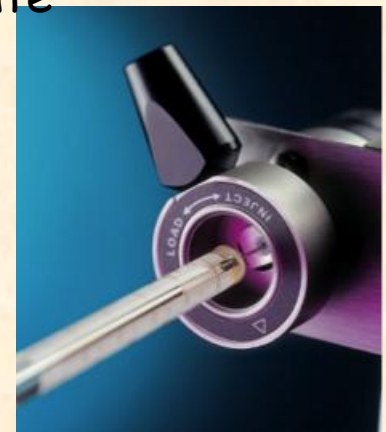
retro



iniettore



fronte

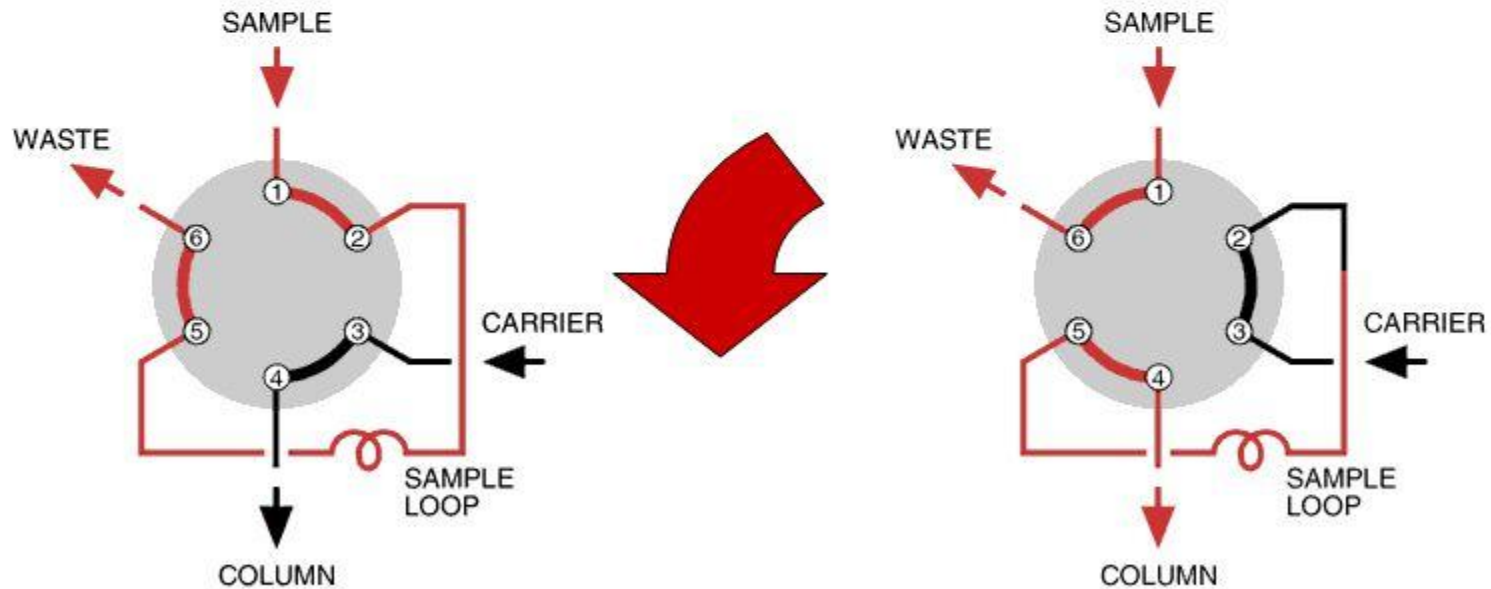


Siringa Hamilton

Valvole di iniezione



L'interfaccia universalmente utilizzata per introdurre il campione è la valvola a 6 (o 7) vie.



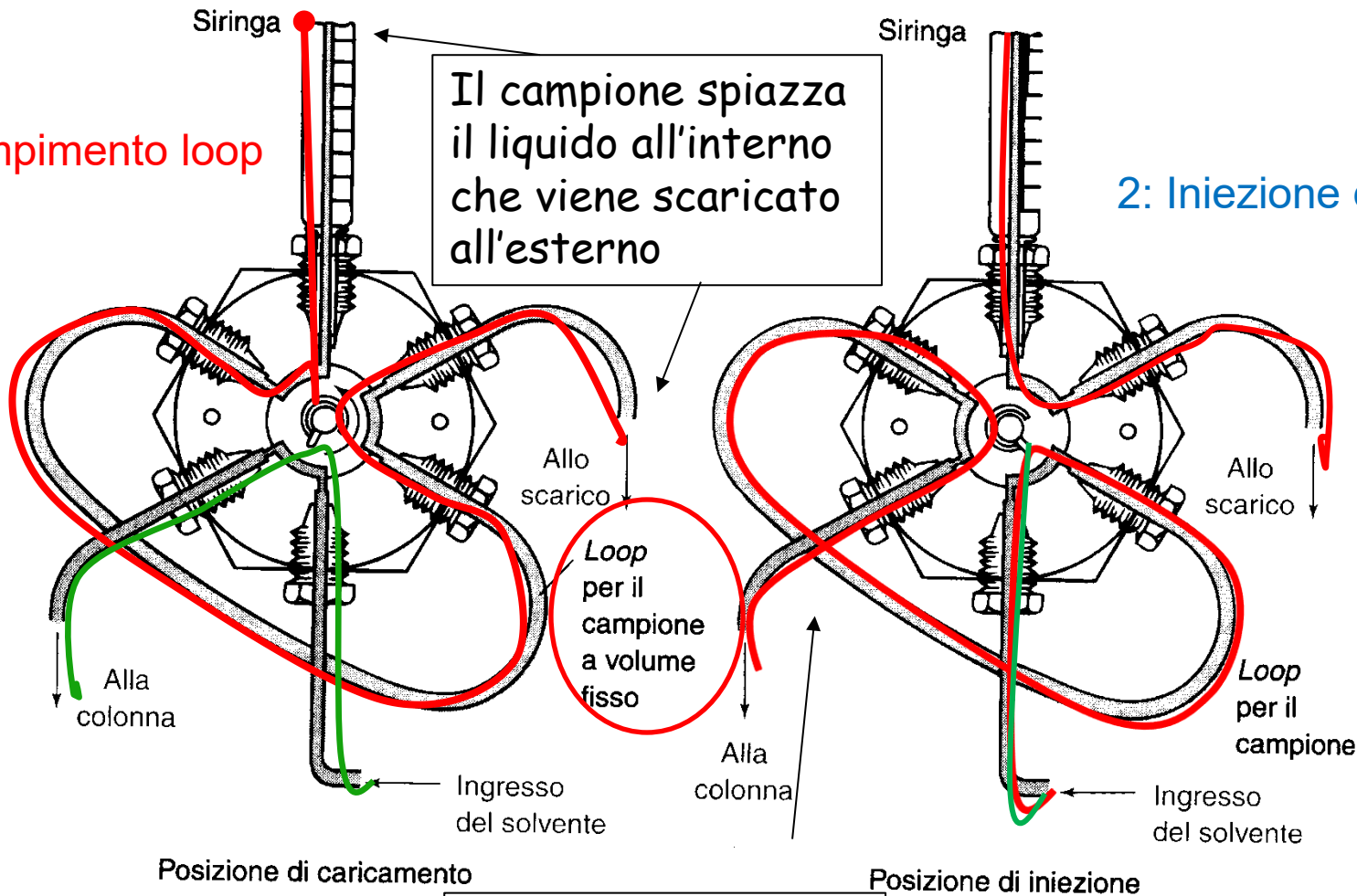
A seconda del **loop** montato varia il volume del campione iniettato in colonna
Loop : diverse dimensioni di diametro e lunghezza (10, 50,100 fino ad 1 mL)

Valvola di iniezione

Il campione viene immesso in colonna dal loop senza interrompere il flusso di FM in colonna

1: Riempimento loop

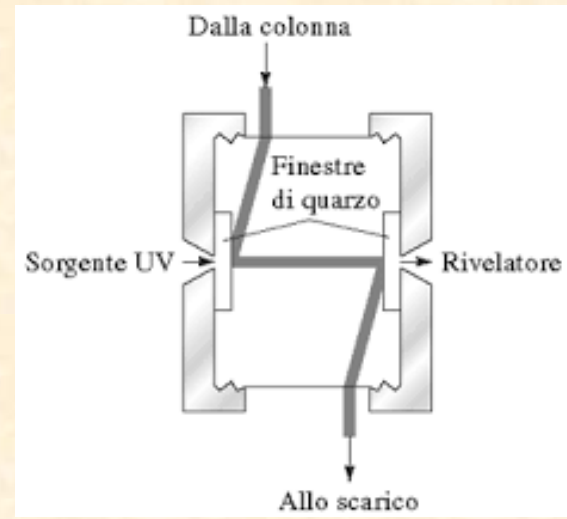
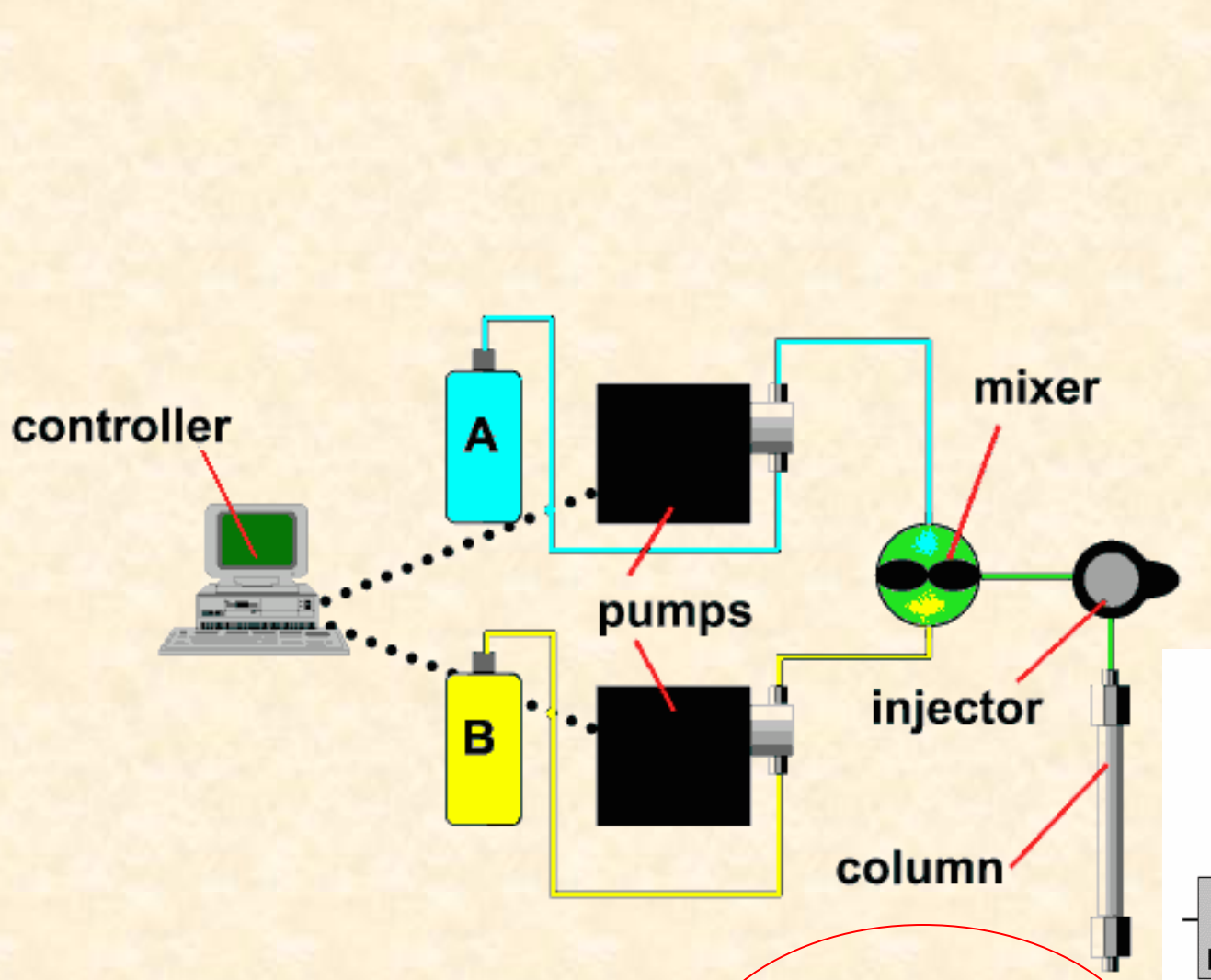
2: Iniezione del campione



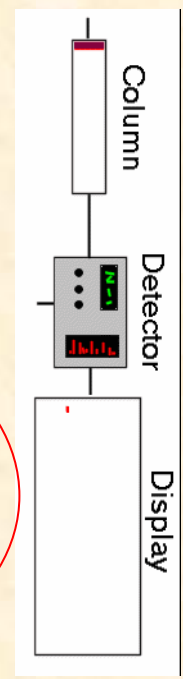
Il campione spiazza il liquido all'interno che viene scaricato all'esterno

Viene chiuso il circuito e il campione viene indirizzato verso la colonna

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



Rivelatore:
 Fotometro
 Spettrofotometro
 Fluorimetro



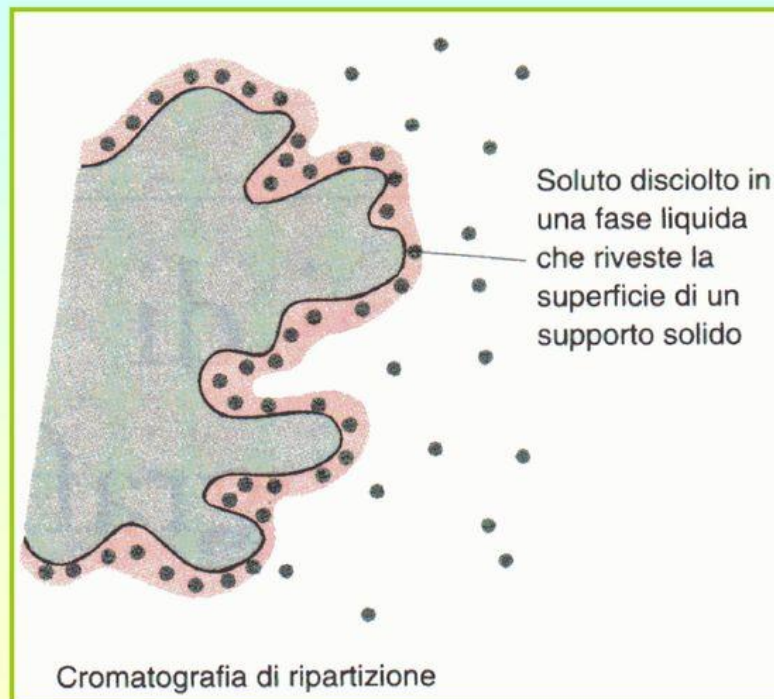
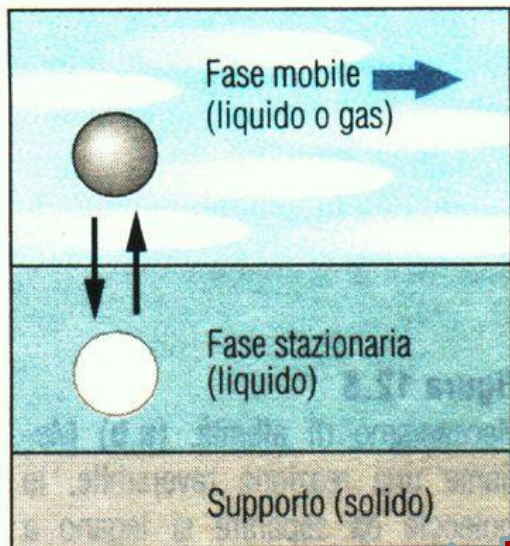
↑
 Cella a flusso

I SISTEMI HPLC RICADONO ALL'INTERNO DELLA Cromatografia di ripartizione: purificare farmaci, proteine e aminoacidi

sebbene tutti i metodi cromatografici si basino sulla ripartizione degli analiti tra le due fasi, storicamente si parla di crom. di ripartizione quando entrambe le fasi sono liquide

Ripartizione

La fase stazionaria è un liquido che ricopre un supporto solido.



 SILICE

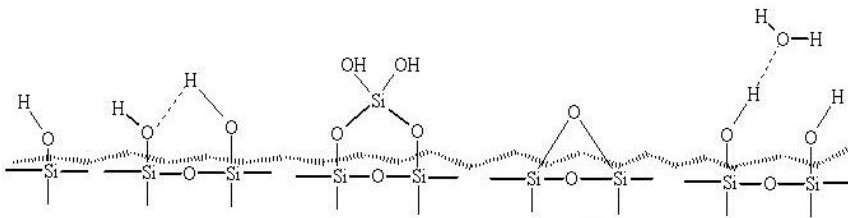
cromatografia liquido-liquido

silice

lega fino al
50% di acqua

Svantaggio: durante l'eluizione
distacco parziale di FS

Fase stazionaria: la silice è di gran lunga la più utilizzata. E' un materiale altamente polare per la presenza di **gruppi silanolo SiOH**



Forma isolata o libera:
alta capacità di adsorbimento

Forma legate con formazione di
legame idrogeno o silossani:
bassa capacità di adsorbimento

Una stabilizzazione dell'attività della superficie della silice può essere ottenuta controllando il contenuto di acqua della fase mobile (*fase mobile isodrica*).

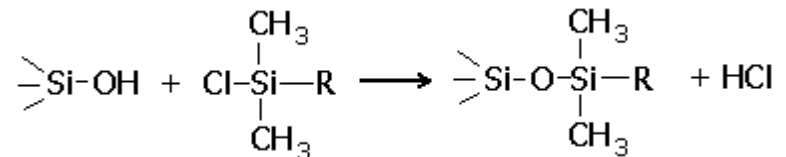
La silice presenta una serie di svantaggi quali:

- ⇒ Stabilità in un intervallo limitato di pH
- ⇒ Adsorbimento irreversibile di analiti fortemente polari
- ⇒ Necessità di un controllo rigoroso del contenuto di acqua della fase mobile per ottenere risultati riproducibili
- ⇒ Lenta riequilibrio al cambiamento della composizione della fase mobile

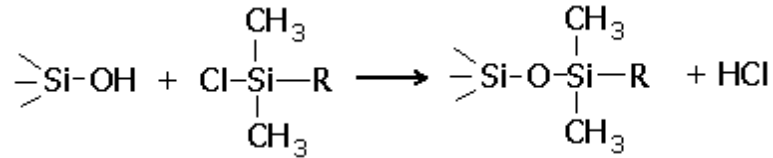
Tali svantaggi sono in parte superati utilizzando silice modificata con gruppi cianopropilici, amminopropilici, diolici

cromatografia liquida a fase legata

In questo caso si utilizza come matrice la silice, derivatizzata con clorosilani organici



matrice : silice derivatizzata con clorosilani organici



crom. liquida in fase normale
NP-HPLC

R=fase stazionaria polare

alchilammina legata alla silice

Fase mobile (esano) apolare

Eluizione in gradiente a polarità crescente

Ordine di eluizione: analiti in ordine di polarità crescente

Eccellente per separazione di analiti apolari

crom liquida in fase inversa RP-HPLC

R=fase stazionaria apolare

butile (C4), ottile(C8), ottadecile (C18)

Fase mobile polare : *acqua/metanolo o acqua/acetonitrile*

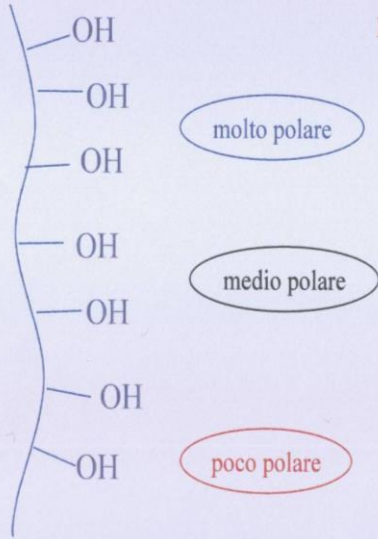
eluizioni in gradiente a polarità decrescente

ordine di eluizione: analiti in ordine di polarità decrescente

Per analiti polari (solubili in acqua), di media polarità, e talvolta non-polari

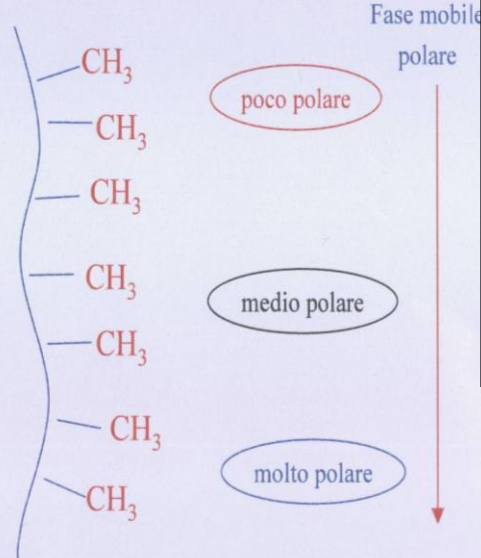
Cromatografia a fase normale

Il letto stazionario è polare, la fase mobile è non polare o meno polare



Cromatografia a fase inversa

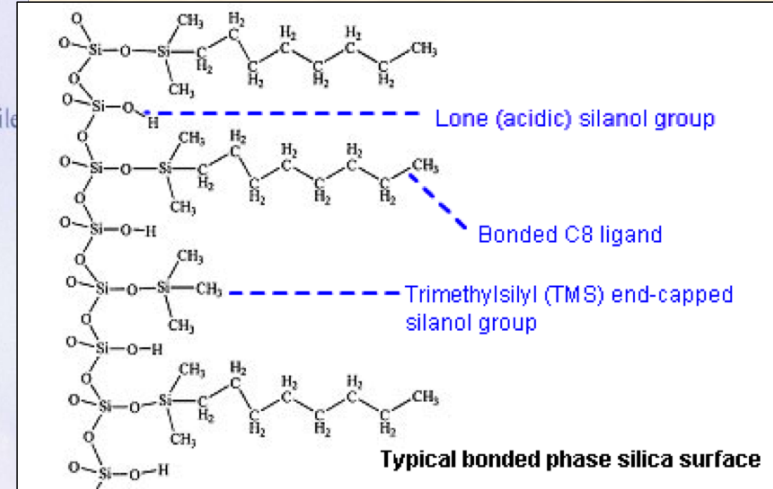
Il letto stazionario è apolare, la fase mobile è polare o più polare



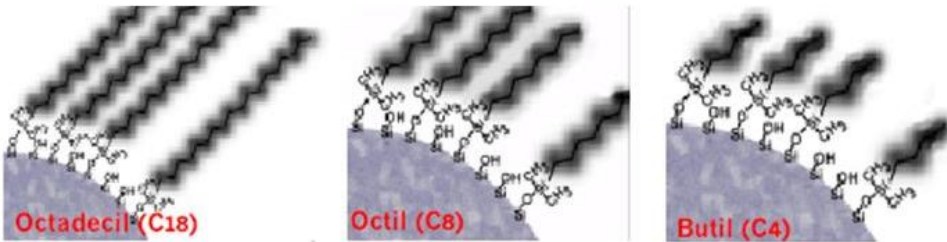
Ordine di eluzione: in ordine di polarità crescente

ordine di eluzione: analiti in ordine di polarità decrescente

END-CAPPING con di/trimetilclorosilano

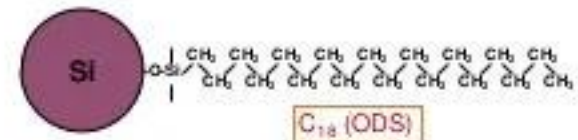


Cromatografia di ripartizione a FASE INVERSA (RP-HPLC)



Separation Column for Reversed Phase Chromatography

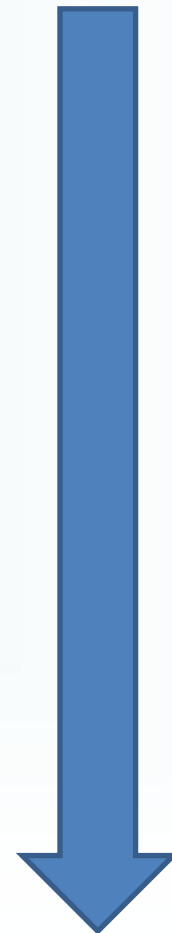
- C₁₈ (ODS) type
- C₈ (octyl) type
- C₄ (butyl) type
- Phenyl type
- TMS type
- Cyano type



Il processo di eluizione

In *cromatografia di adsorbimento*, le molecole di solvente competono con le molecole di soluto per la fase stazionaria: l'eluizione avviene quando il solvente sposta il soluto dalla fase adsorbente. La **forza eluente** (ϵ°) è una misura dell'energia di adsorbimento di vari solventi sulla superficie di silice, scegliendo come 0 di riferimento il pentano. Si è creata così la seguente scala definita **serie eluotropica** di vari solventi.

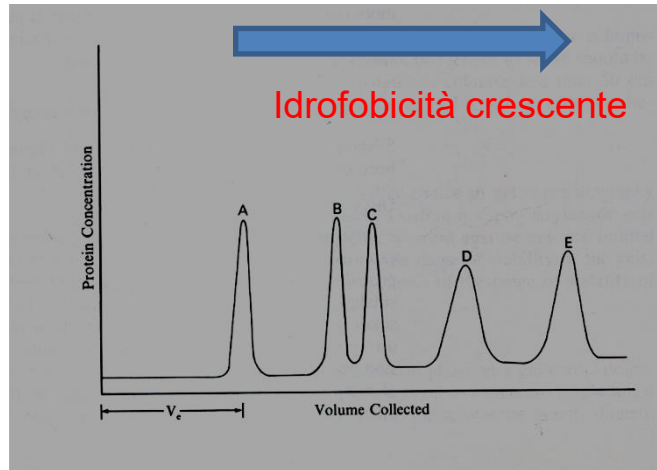
Solvente	Forza eluente (ϵ°)
Pentano	0.00
Esano	0.01
Eptano	0.01
Triclorotrifluoroetano	0.02
Toluene	0.22
Cloroformio	0.26
Diclorometano	0.30
Etere dietilico	0.43
Acetato di etile	0.48
Metil t-butil etere	0.48
Diossano	0.51
Acetonitrile	0.52
Acetone	0.53
Tetraidrofurano	0.53
2-propanolo	0.60
Metanolo	0.70



POLARITA'

la RP-HPLC ha similitudini con la Cr per INTERAZIONI IDROFOBICHE

Fase stazionaria: **apolare**
Fase mobile: **polare**

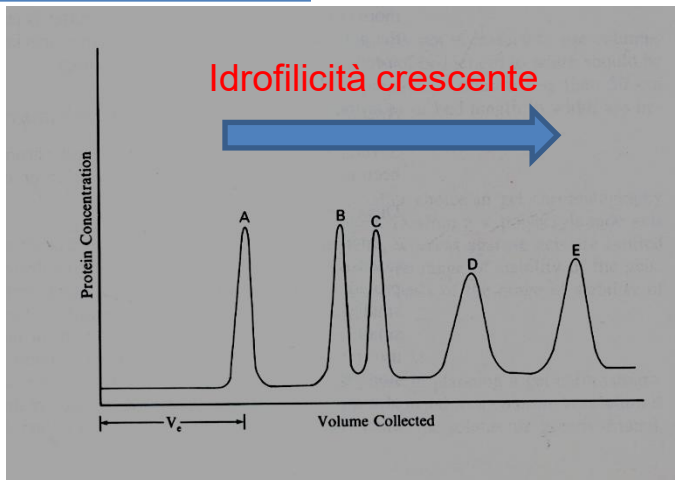


PROTEINA MENO IDROFOBICHE:

PROTEINA PIÙ IDROFOBICHE

NP-HPLC

Fase stazionaria: **polare**
Fase mobile: **apolare**

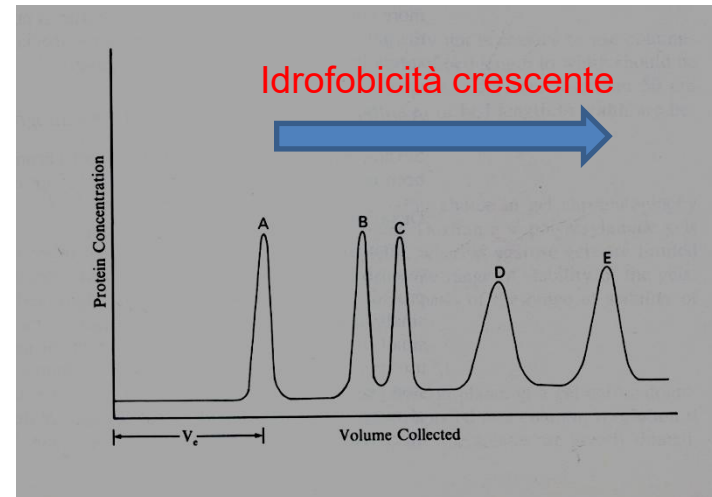


PROTEINA PIÙ IDROFOBICHE

PROTEINA MENO IDROFOBICHE:

RP-HPLC

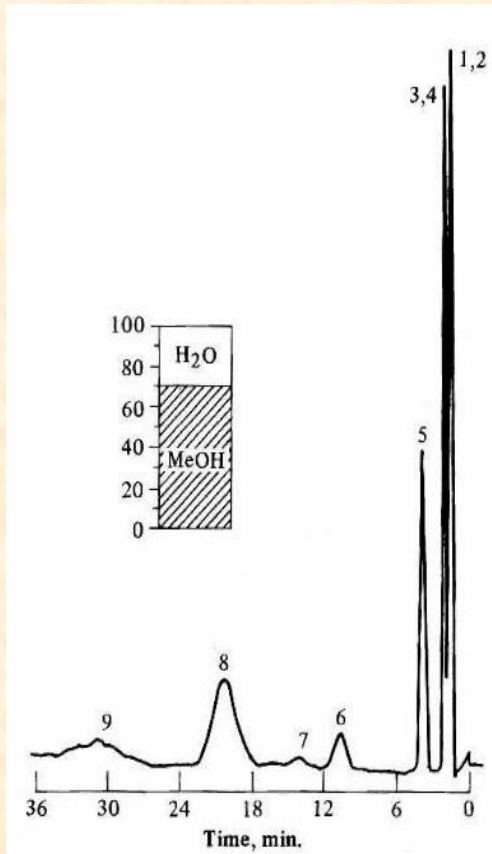
Fase stazionaria: **apolare**
Fase mobile: **polare**



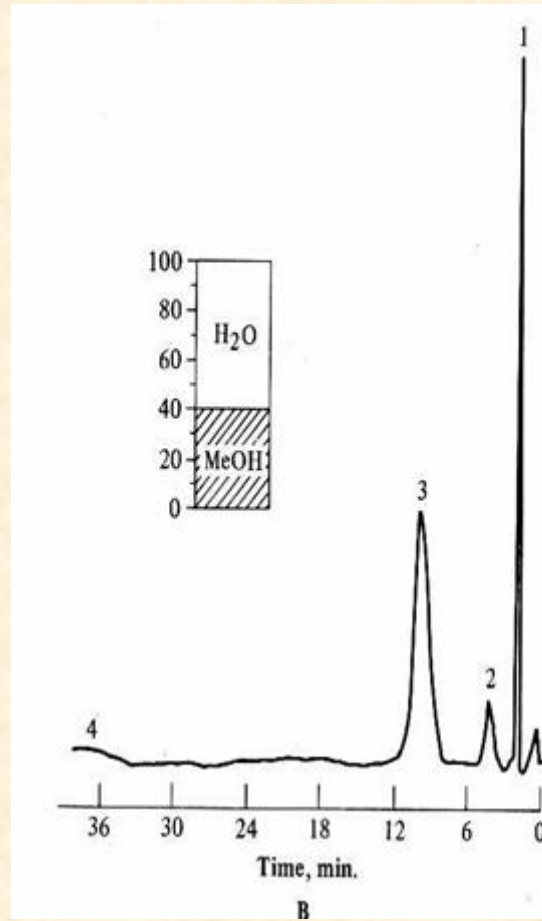
PROTEINA MENO IDROFOBICHE:

PROTEINA PIÙ IDROFOBICHE

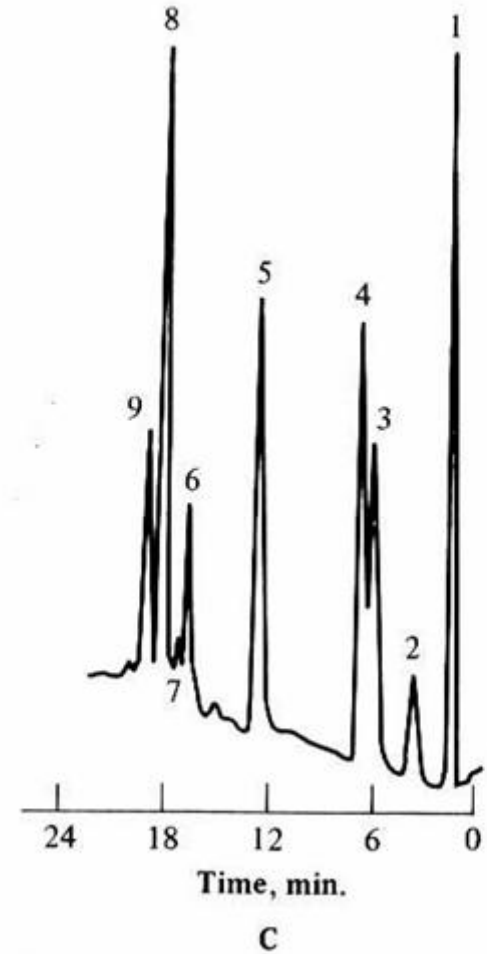
Isocratica o gradiente?



isocratica
(più forte)



isocratica
(meno forte)



gradiente

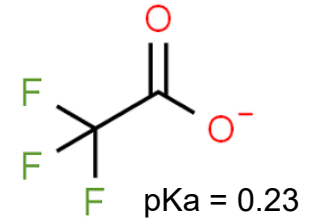
Per la separazione di miscele di composti polari

(amminoacidi, proteine, nucleotidi): **ION-PARING RP-HPLC**

Condizioni sperimentali x RP-HPLC applicata alla separazione di aa e peptidi:

FM: acqua + acetonitrile + TFA 0.1% → acidifica la soluzione a ~pH 2

In questo modo si realizzano le seguenti condizioni:



1) Soppressione ionica: pH aggiustato per avere specie ioniche tutte della stessa carica

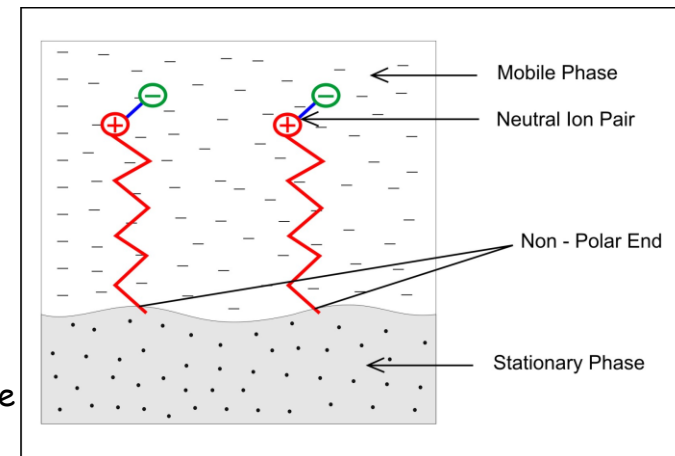
- i gruppi silanolici liberi della FS: a pH 2 sono Si-OH (possono ionizzare a Si-O⁻ a pH maggiori)

- i gruppi -COOH delle cat. lat. di Asp (pKa= 3.65) e Glu (pKa=4.25) sono protonati:
l'analita ha carica netta **POSITIVA**

2) Accoppiamento ionico: il TFA funge da controione di carica opposta a quello dell'analita da separare

- i gruppi R⁺ interagiscono con CF₃COO⁻ (TFA)

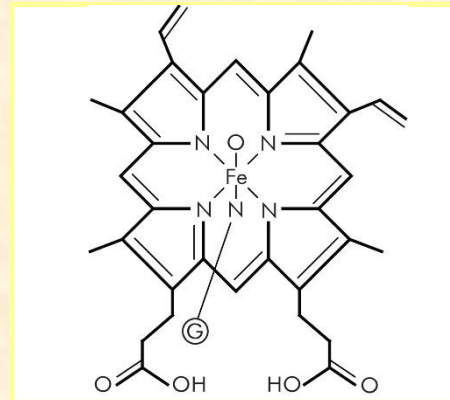
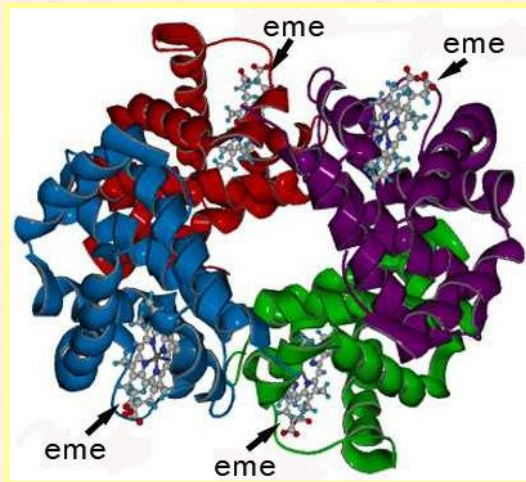
→ Complessivamente prevale il carattere idrofobico degli AA

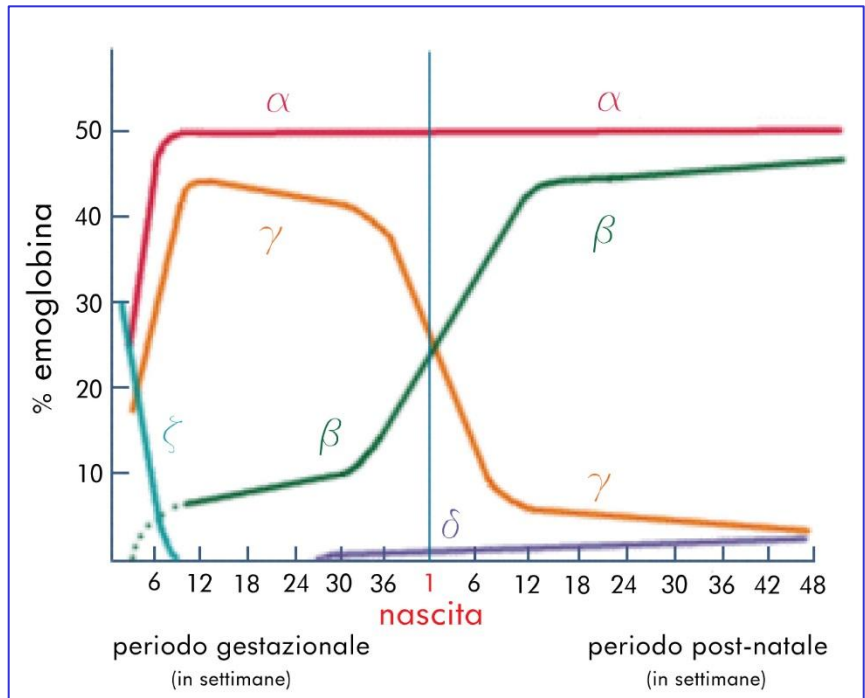


ordine di eluizione: analiti in ordine di polarità decrescente

Applicazione delle tecniche cromatografiche

Caratterizzazione di una variante emoglobinica





Hb embrionale

Hb Gower I ($\zeta_2 \epsilon_2$)

Hb Gower II ($\alpha_2 \epsilon_2$)

Hb Portland ($\gamma_2 \epsilon_2$)

Hb fetale

($\alpha_2 \gamma_2$)

($\alpha_2 \delta_2$)

Hb adulta

HbA ($\alpha_2 \beta_2$)

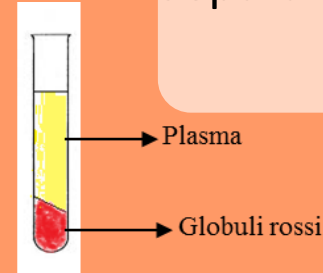
HbA₂ ($\alpha_2 \delta_2$)

Purificazione dell'emoglobina dai globuli rossi

1

Lavaggio con NaCl 0.9% (soluzione isotonica)
Centrifugare a 2000 rpm per 5 min a 4°C

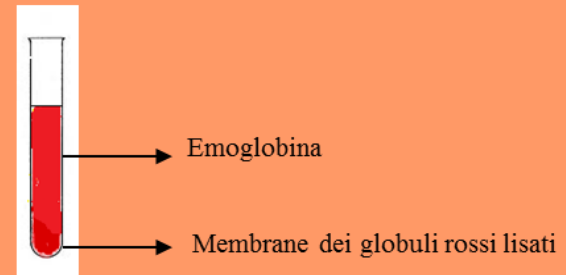
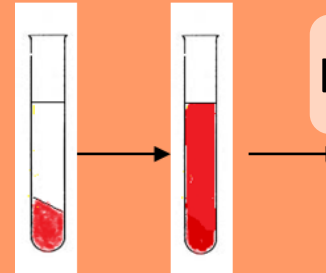
Separazione dei globuli rossi
dal plasma



2

H₂O distillata (soluzione ipotonica)
Centrifugare a 18000 rpm per 20 min a 4°C

Lisi dei globuli rossi

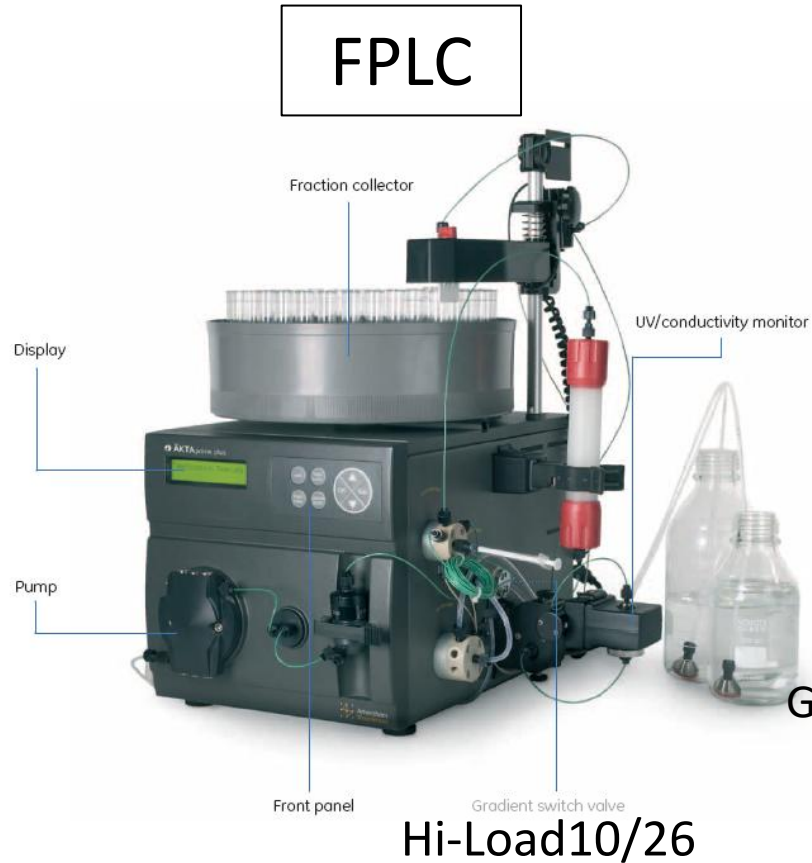


Purificazione di emoglobine varianti umane adulte

Purificazione di emoglobine varianti umane fetali

Cromatografia a scambio anionico

Purificazione dell'emoglobina



Tamponi

A: Tris 20 mM, pH 8.5,

B: Tris 20 mM pH 8.5 + 0,2M di NaCl

Eluizione

Gradiente dallo 0 al 100% di B in 2 h

Flusso: 5 ml/min

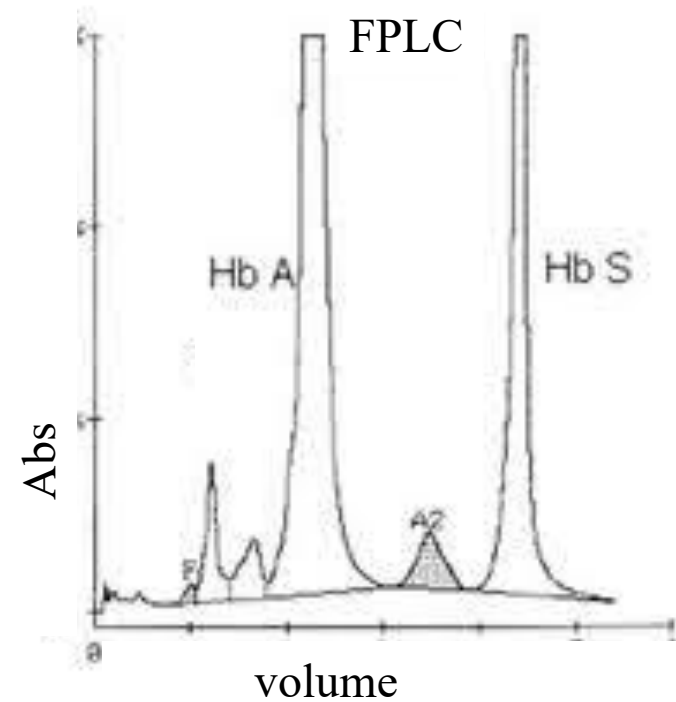
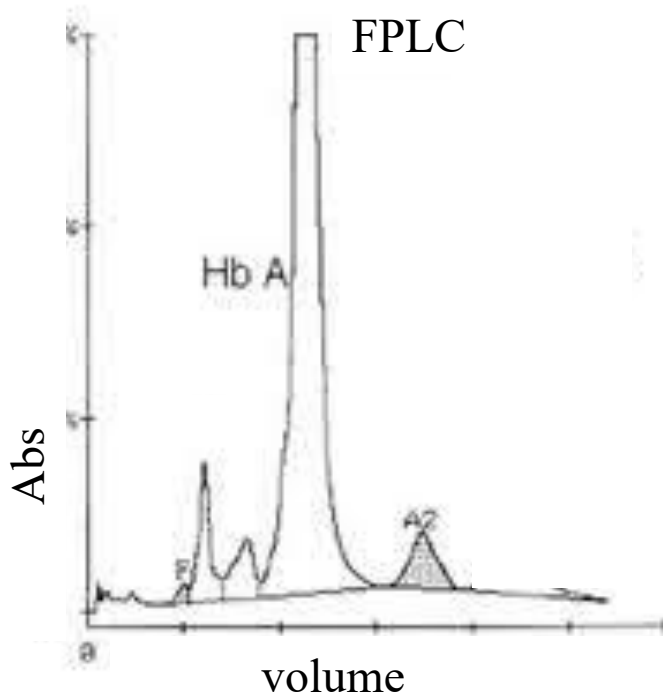
Emoglobina adulta

HbA ($\alpha_2 \beta_2$)

HbA₂ ($\alpha_2 \delta_2$)

Eterozigote HbS-HbA

● HbS β_6 (Glu→Val)



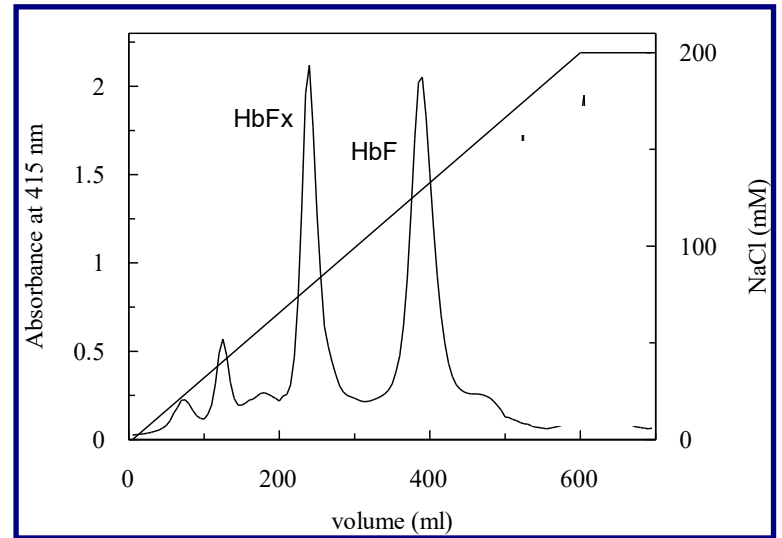
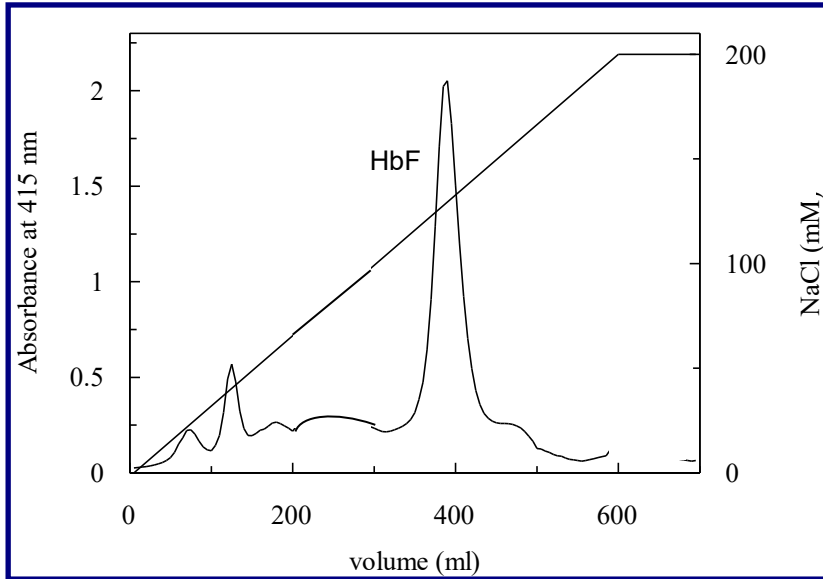
● Variante fetale eterozigote HbF $G\gamma 93$ (F9) Cys \rightarrow Arg,

HbF

$(\alpha_2 \gamma_2)$

$(\alpha_2^{G\gamma} \gamma_2)$

$(\alpha_2^{G\gamma^x} \gamma_2)$



Hi-Load 26/10 in Tris 20mM pH 8.5
gradiente lineare di NaCl da 0 a 0.2M

RP-HPLC

FASE A: ACN 20%+TFA 0.1%
FASE B: ACN 60%+ TFA 0.1%

Colonna: Colonna Vydac C4

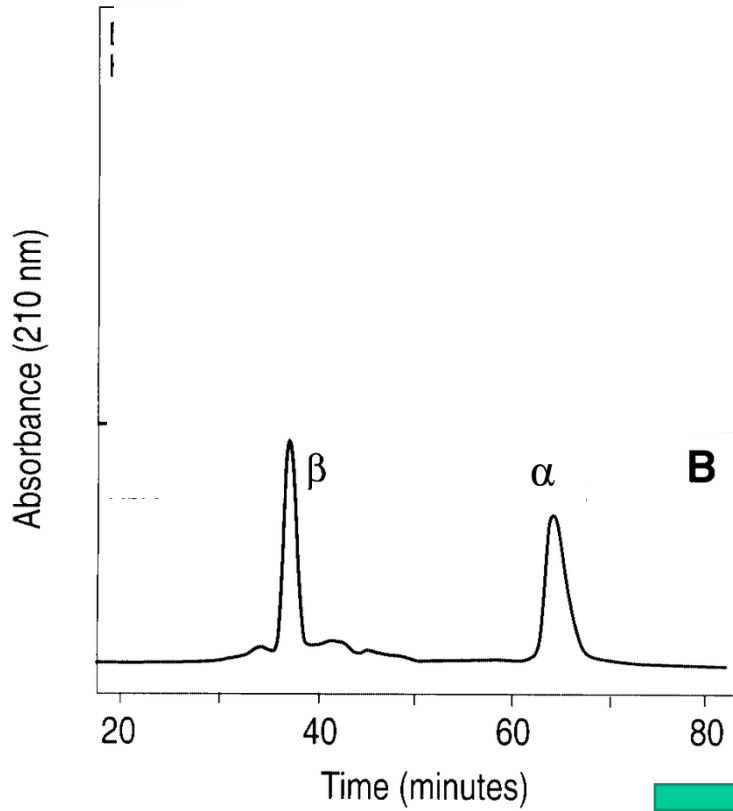
Flusso: 1 mL/min

Eluizione: 20-60% B 90 minuti



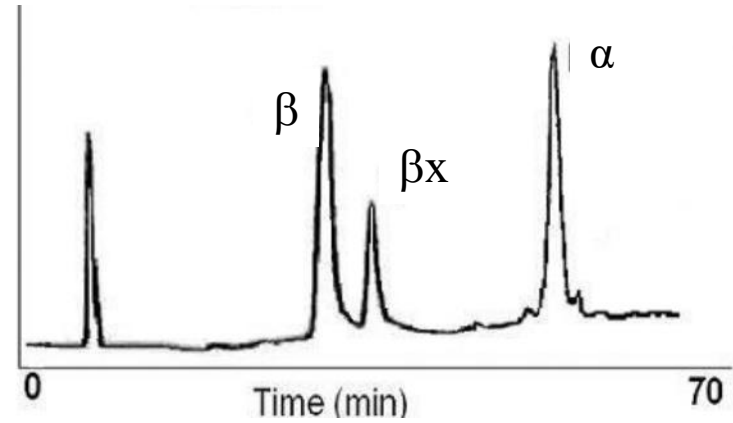
RP-HPLC

Emoglobina adulta



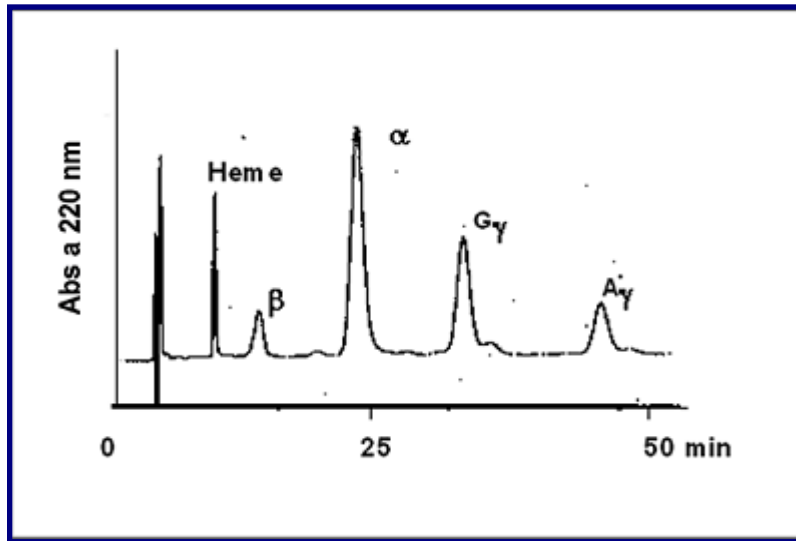
HbS-HbA

● HbS $\beta 6(\text{Glu} \rightarrow \text{Val})$



Idrofobicit  crescente

RP-HPLC

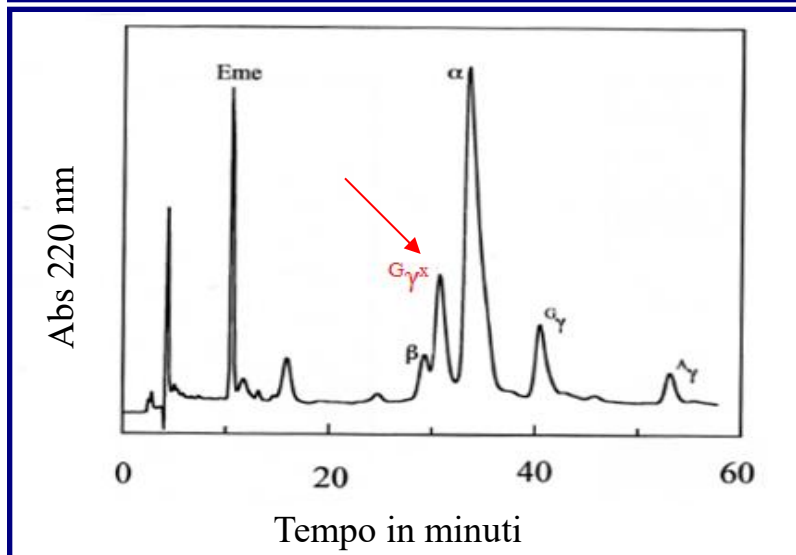


Hb fetale

$(\alpha_2 \gamma_2)$

$(\alpha_2 A\gamma_2)$

Cromatogramma di un neonato normale



● Variante fetale $G\gamma 93$ (F9) Cys \rightarrow Arg,

Cromatogramma di un neonato eterozigote HbF variante

Catene globiniche

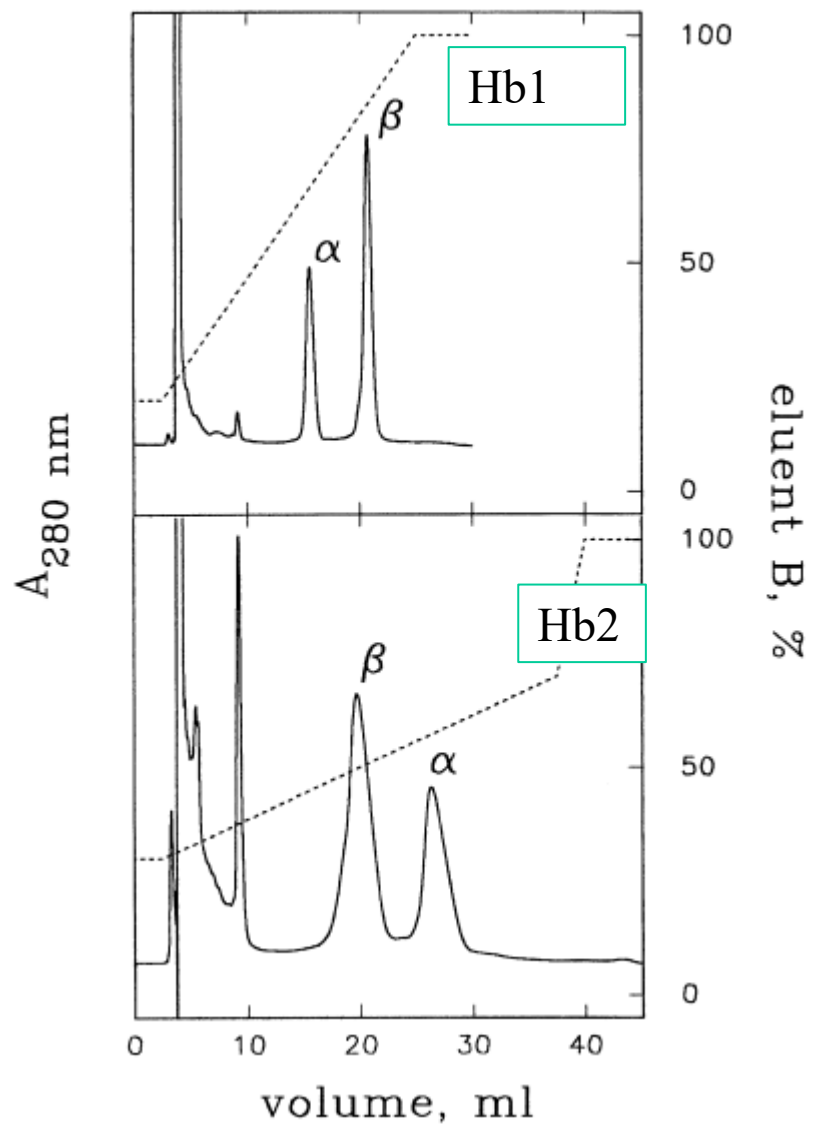
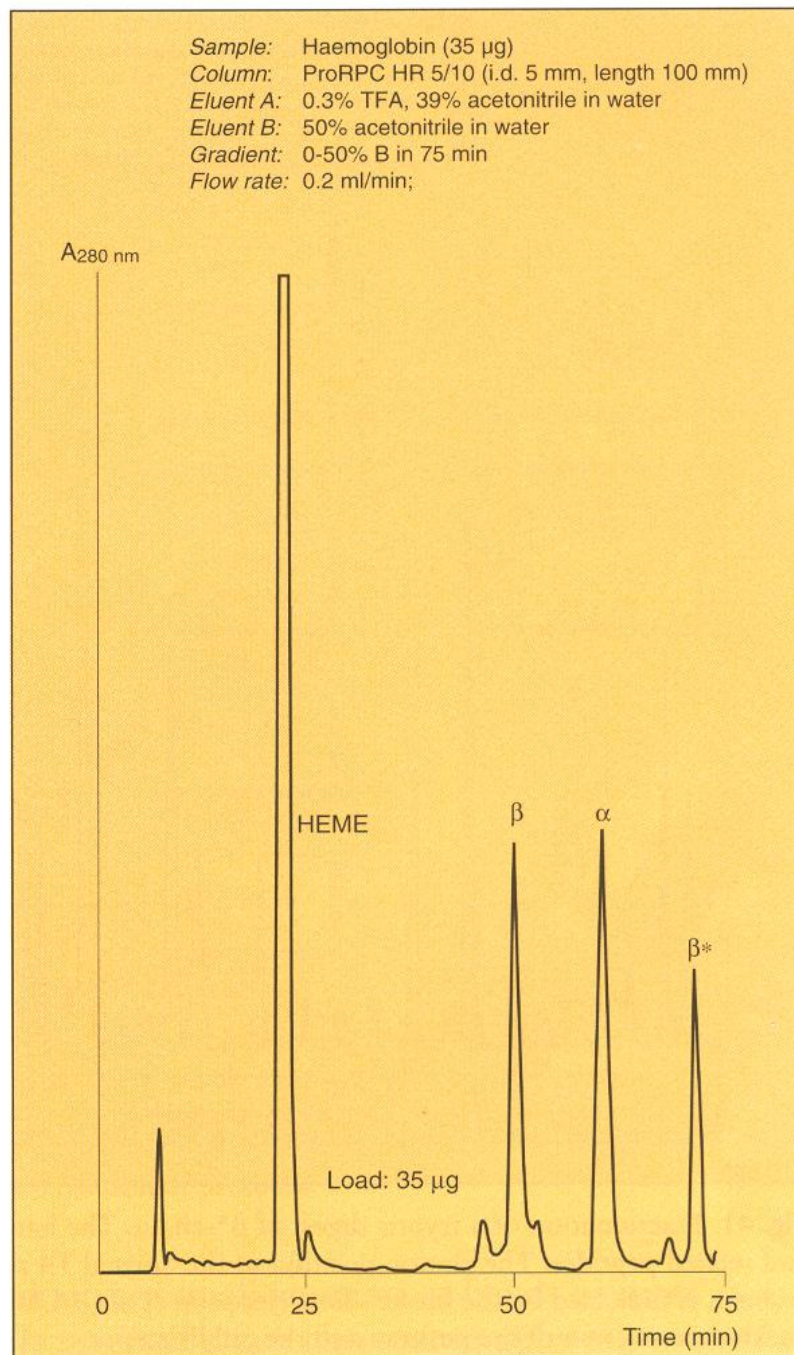
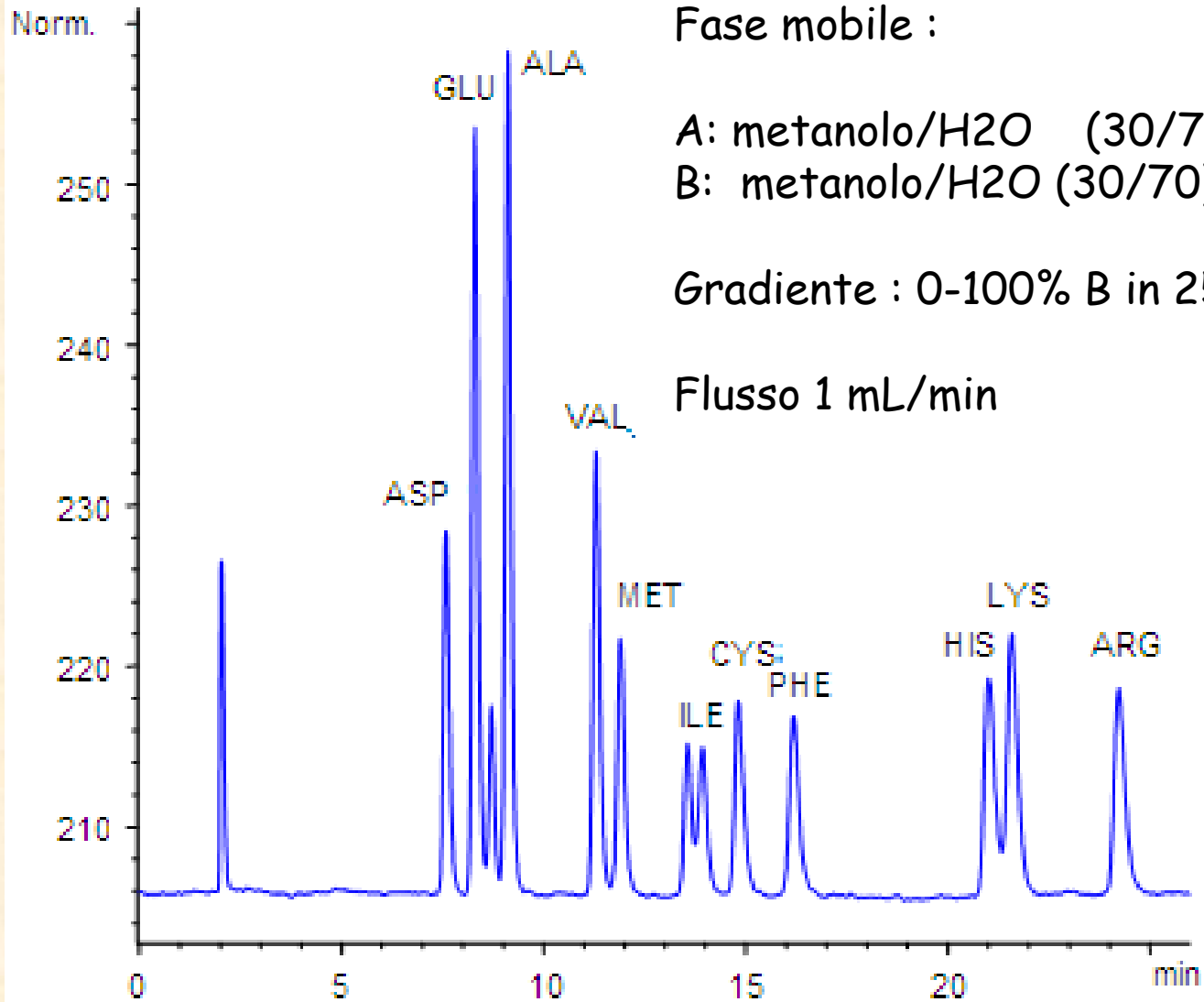


Fig. 40. Separation of the α - and β -chains of a variant of haemoglobin on ProRPC HR 5/10. The β^* -chain resulted from a point mutation which substituted threonine for proline at position 36. (Jeppson et al. J. Chromatogr. 297 (1984) 31-36.) By kind permission of the authors and the publisher.

Picchi molto stretti=
Alta efficienza





Fase mobile :

A: metanolo/H₂O (30/70) + TFA 0,05%

B: metanolo/H₂O (30/70) + TFA 0,3%

Gradiente : 0-100% B in 25 minuti

Flusso 1 mL/min