

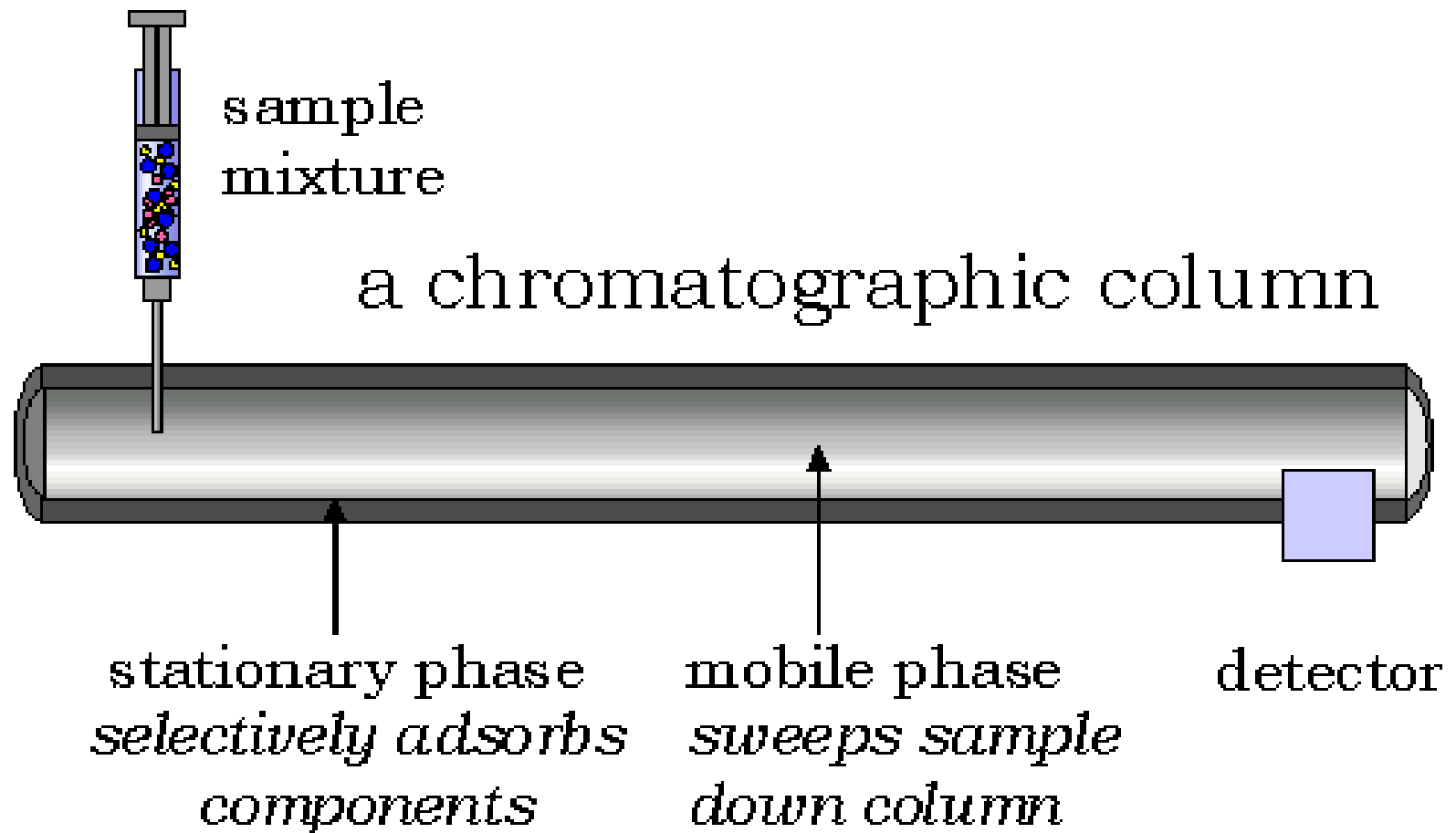
Cromatografia

Dal greco *chroma* : colore, *graphein* :
scrivere

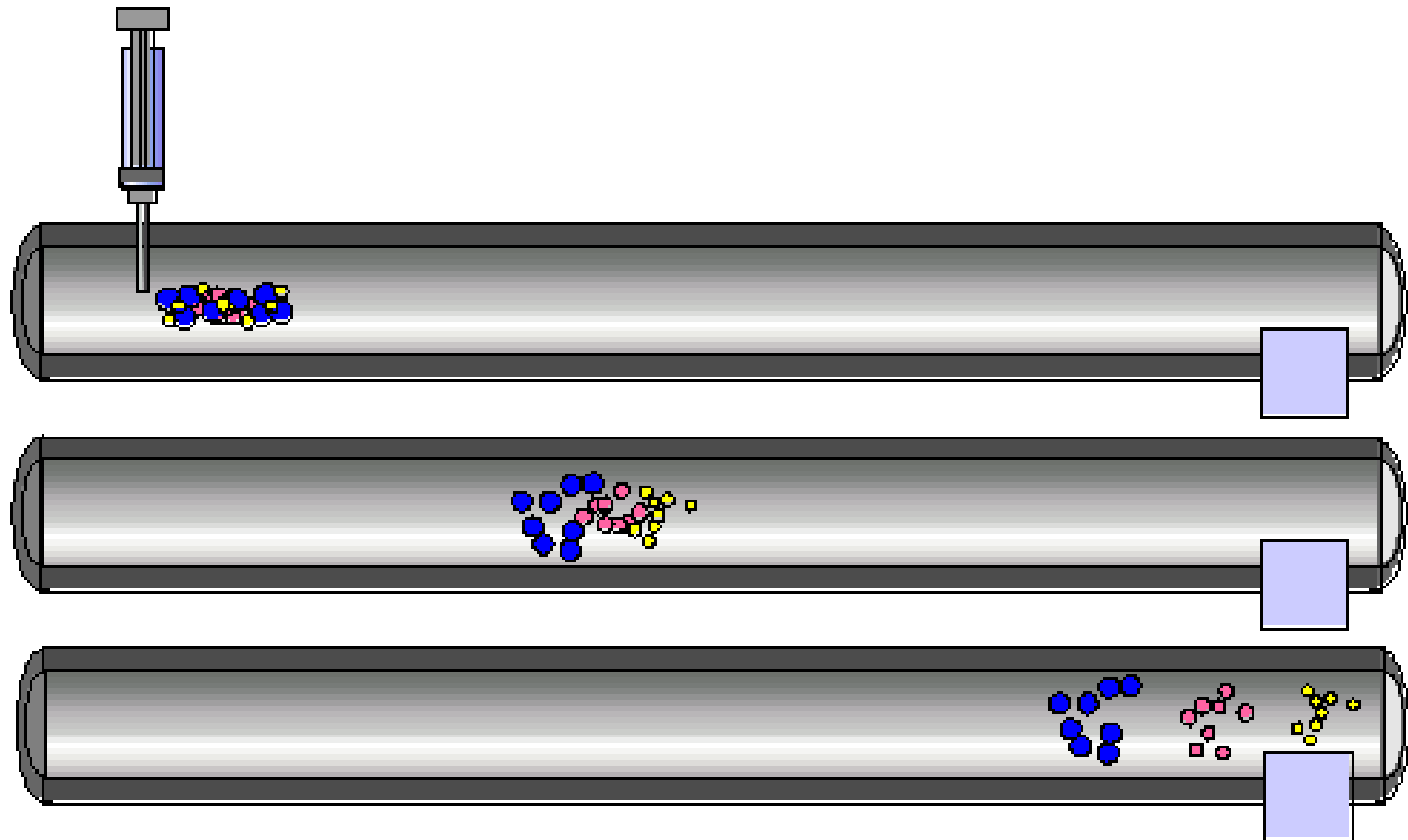
1903 Mikhail Twsett (pigmenti vegetali su
carta)

E' il termine generico che indica una
serie di tecniche di separazione di
molecole simili in base alle loro
proprietà chimiche e fisiche.

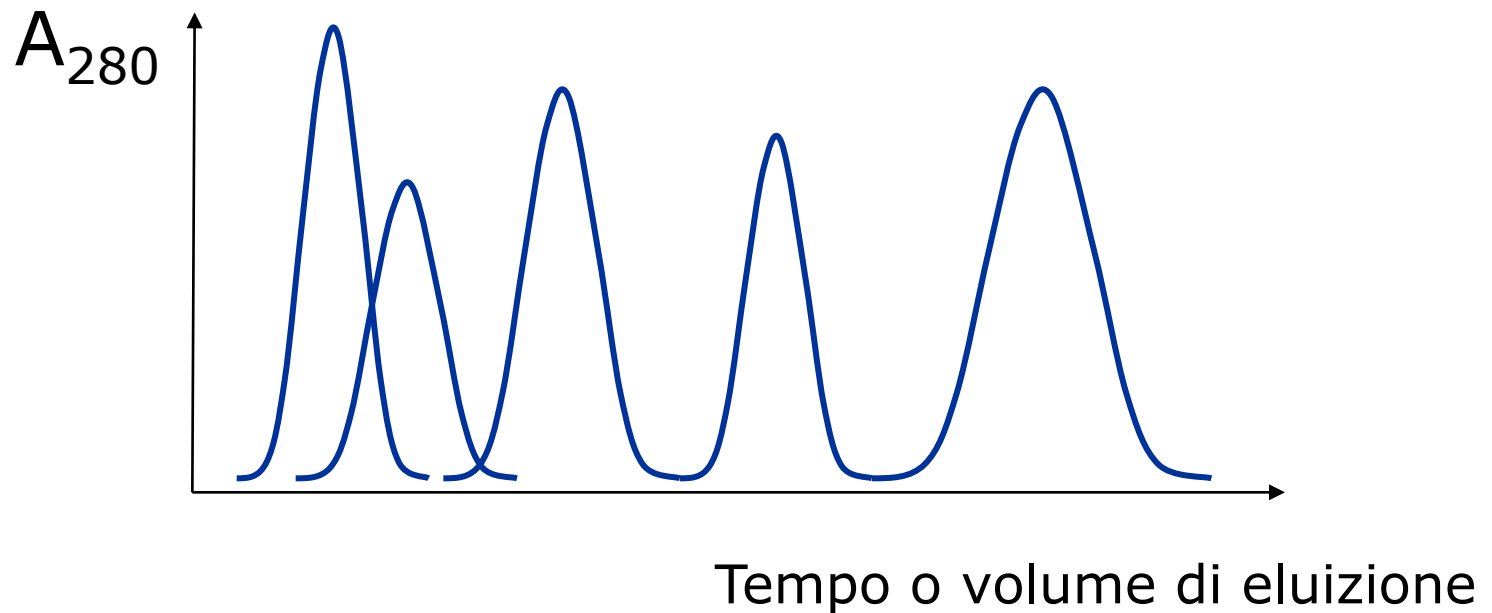
Separation By Chromatography



Separation by Chromatography



Poiché le proteine assorbono la luce a $\lambda = 280$ nm, il detector può anche essere semplicemente un sistema ottico che consente di monitorare la grandezza $A_{280\text{nm}}$



Il **coefficiente di ripartizione** descrive il modo in cui un composto si distribuisce tra due fasi immiscibili

$$[X]_{\text{fase A}} / [X]_{\text{fase B}} = K_d$$

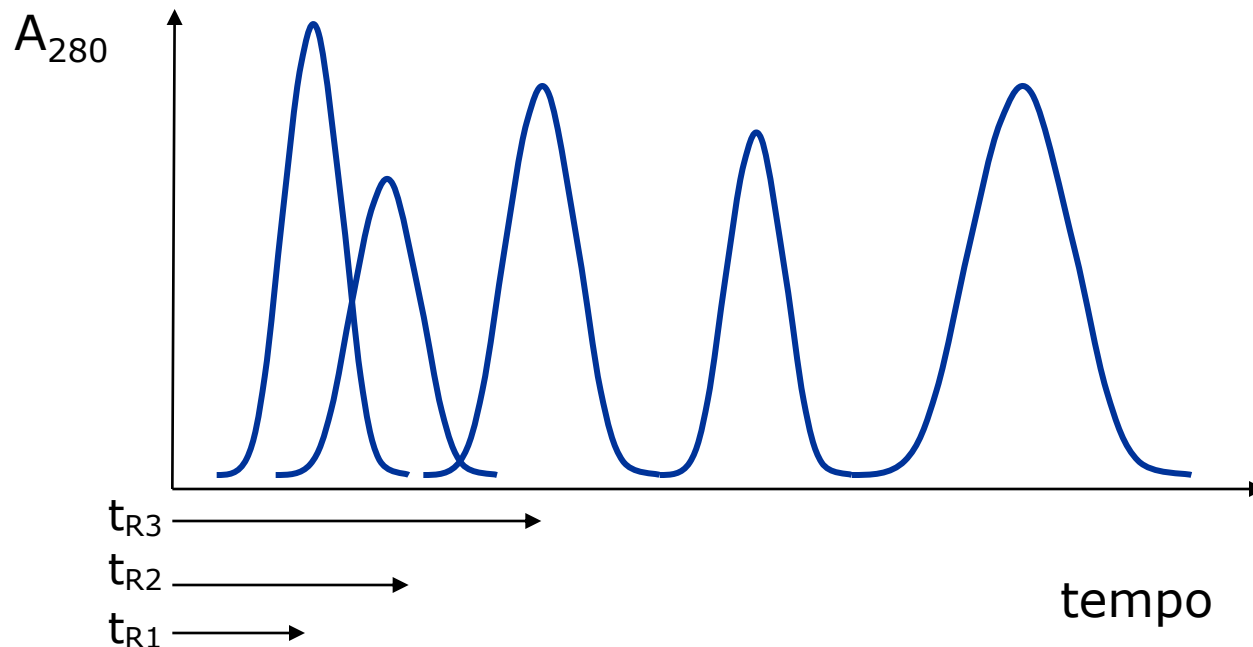
K_d è una costante ad una data temperatura

Il **tempo di ritenzione** t_R descrive il tempo che un composto impiega per attraversare una colonna cromatografica e dipende dal tempo morto t_M che occorre per passare attraverso agli spazi vuoti della fase stazionaria (**volume vuoto**) e dal tempo di ritenzione adattato t'_R in cui il composto viene trattenuto dalle interazioni con la matrice della fase solida

$$t_R = t'_R + t_M$$

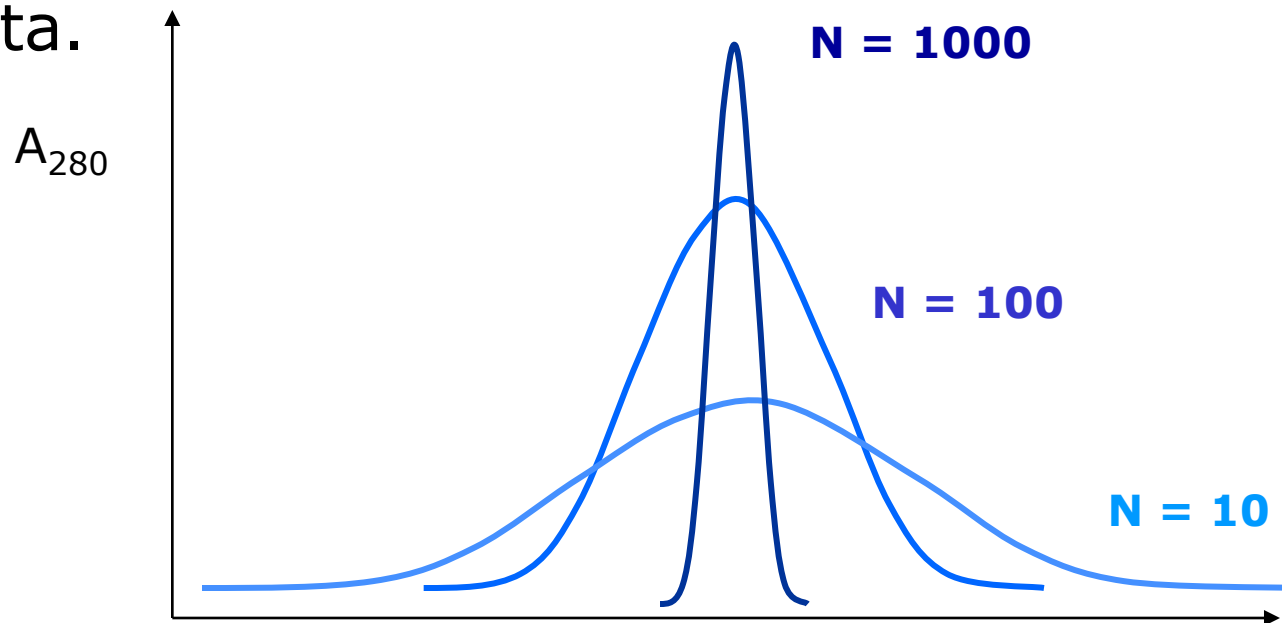
L'**efficienza** di una cromatografia, cioè la sua capacità di separare componenti con proprietà diverse, dipende da :

1. **Fattore di capacità k'** definito come il tempo relativo che occorre al componente per eluire in relazione ad un altro componente che non interagisce con la matrice. k' dipende a sua volta da **K_d** , dalla lunghezza della colonna, da **t_R**



L'**efficienza** di una cromatografia, cioè la sua capacità di separare componenti con proprietà diverse, dipende da :

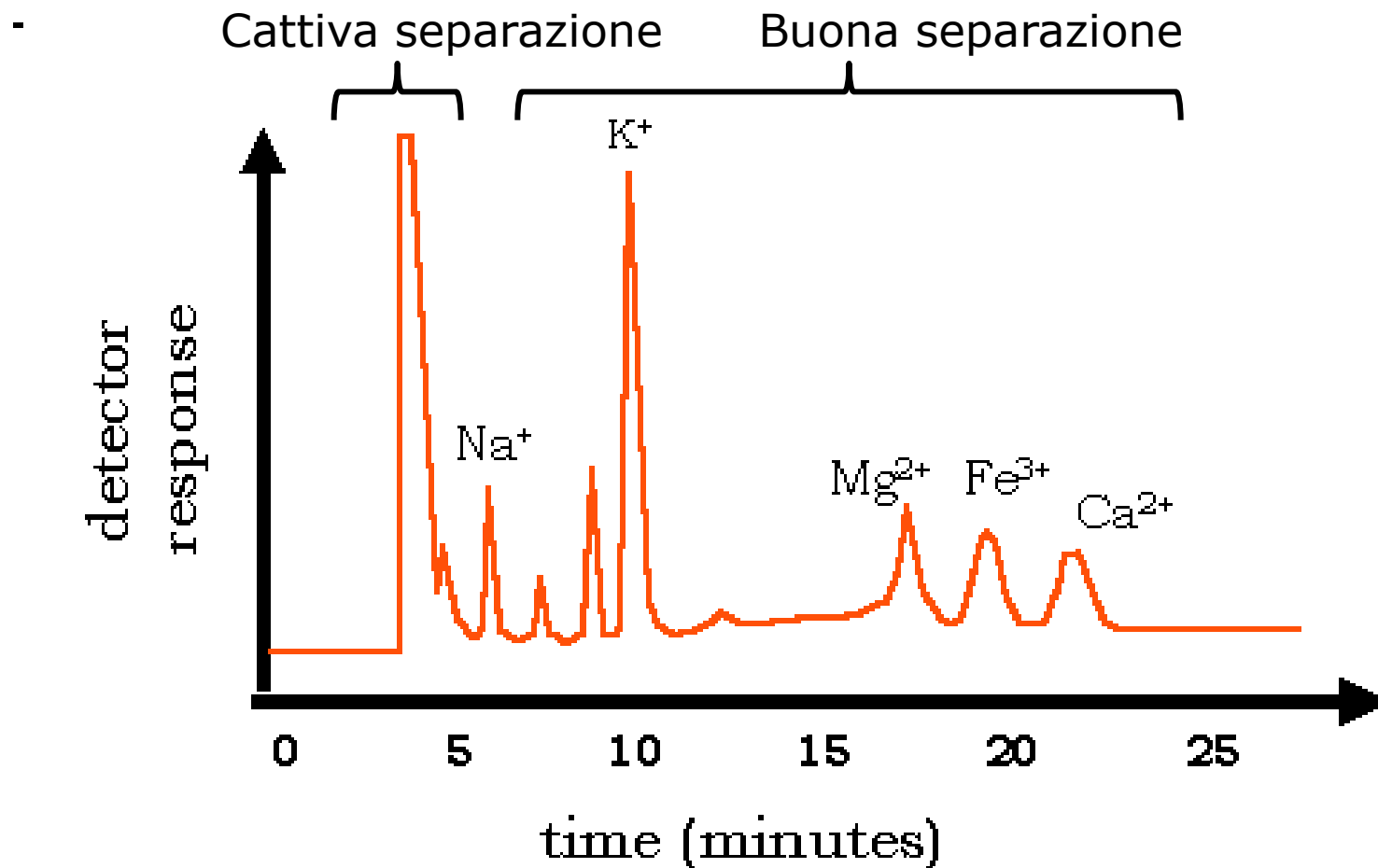
2. numero di piatti teorici N della colonna, che dipendono dalle proprietà geometriche della colonna (lunghezza, diametro) e dalla omogeneità della fase stazionaria (dimensioni e impaccamento della matrice), che influenzano la forma del picco in uscita.



La bontà di uno specifico sistema cromatografico si giudica in base al grado di risoluzione ottenuto e dipende dai seguenti parametri:

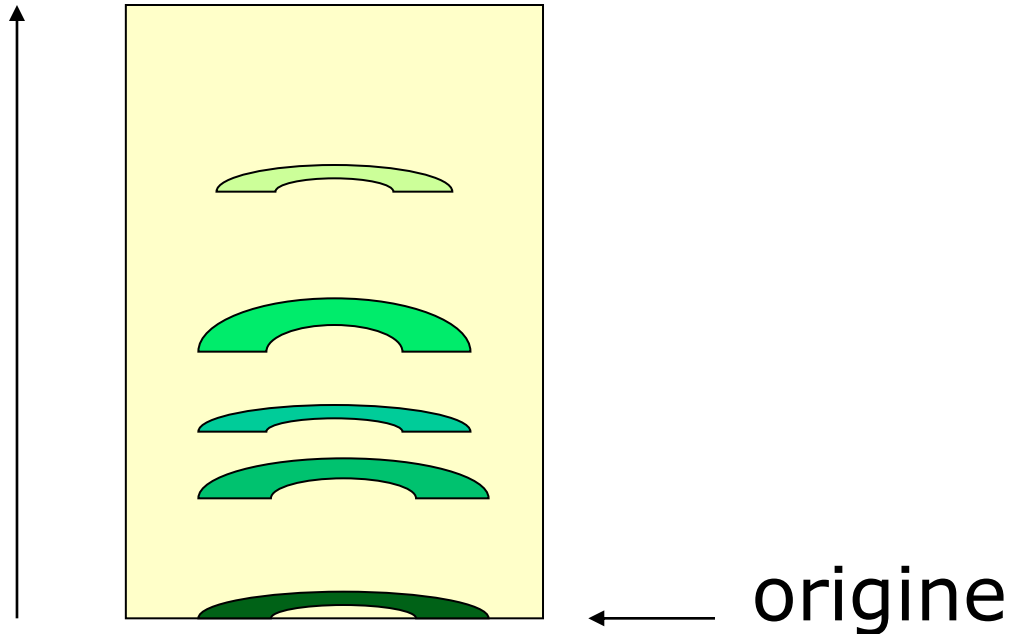
- **selettività**: è la capacità di un sistema cromatografico (fase stazionaria + fase mobile) di discriminare tra due composti strutturalmente correlati e si misura come rapporto tra i tempi di ritenzione;
- **efficienza**: è la misura degli effetti di diffusione che provoca allargamento dei picchi e la loro sovrapposizione;
- **capacità**: è la misura della quantità di materiale che può essere risolto senza sovrapposizione dei picchi.

Ion chromatogram of orange juice



Cromatografia **su carta**

Migrazione del
solvente per
capillarità



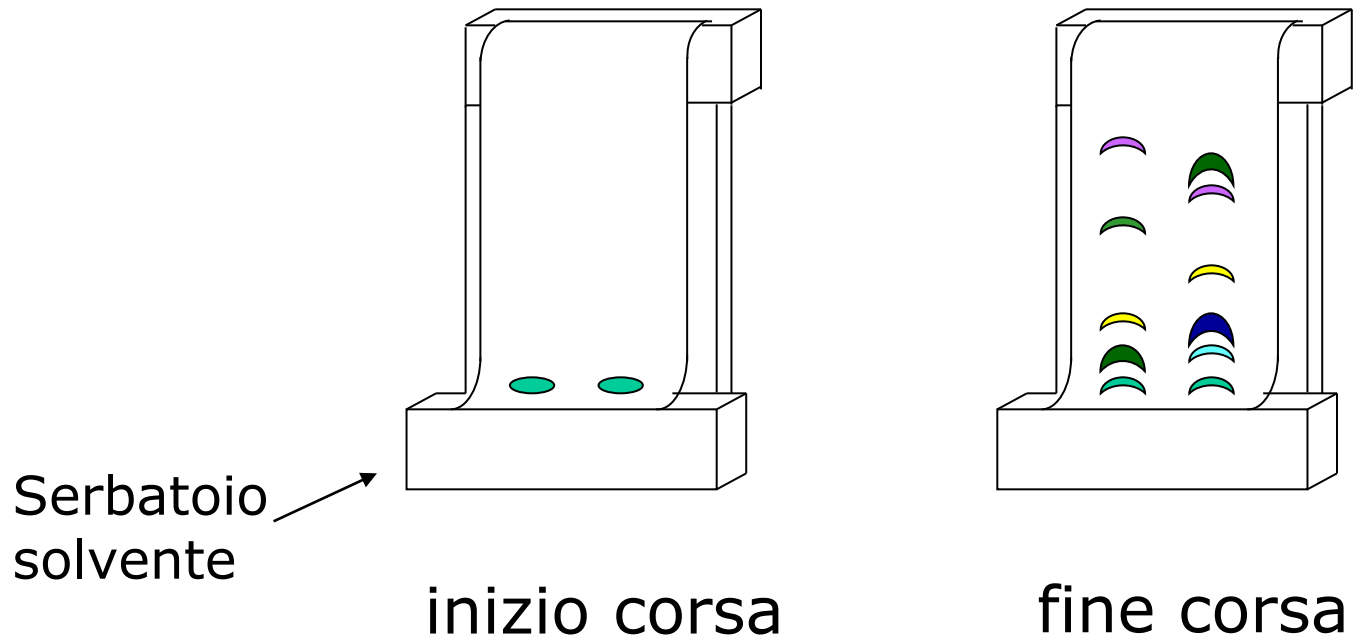
Fase **mobile** : gas o liquido contenenti il campione
Fase **stazionaria** : liquido o solido

Cromatografia su strato sottile (TLC)

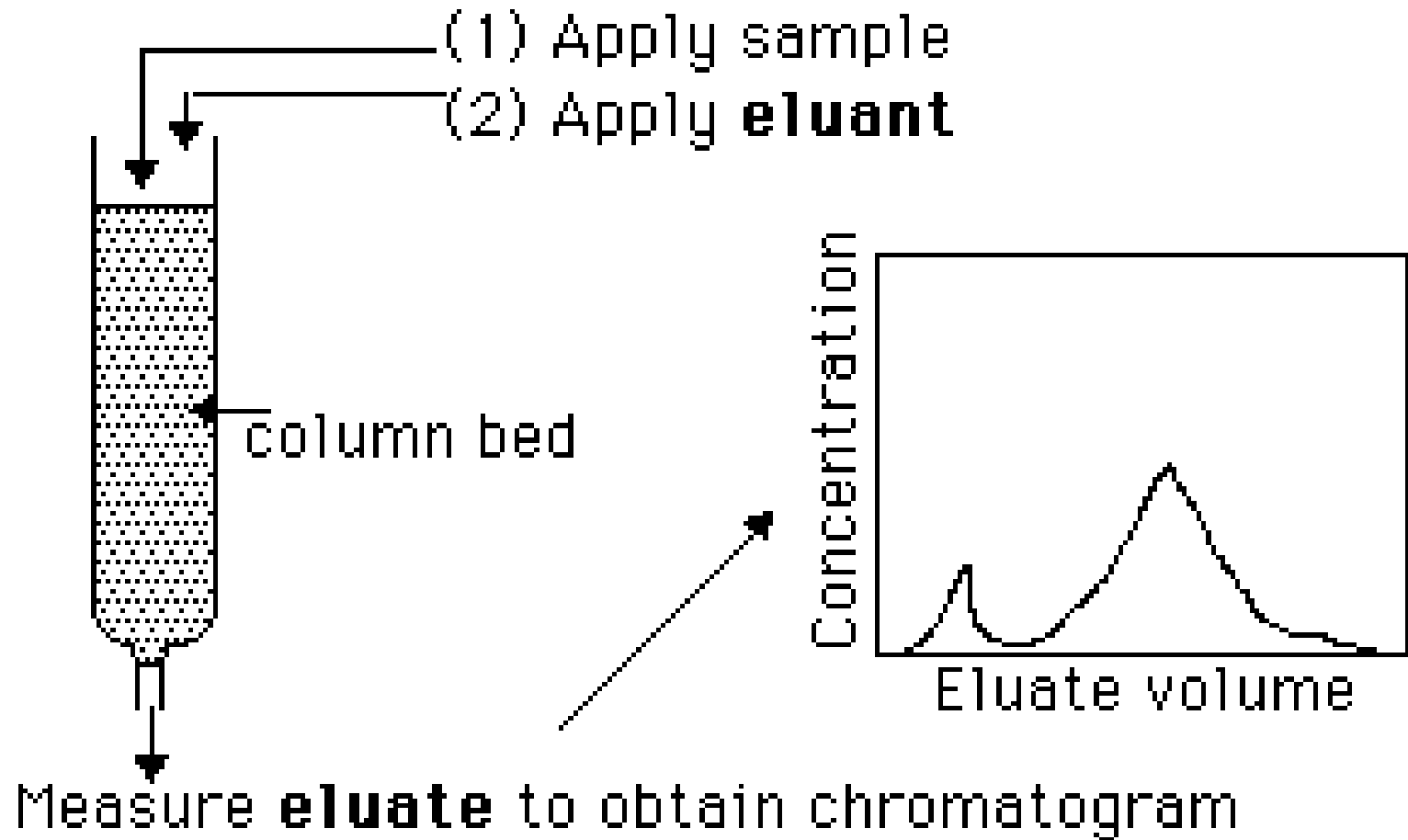
Fase stazionaria : piastrine di vetro rivestite di cellulosa

Fase mobile: solventi organici

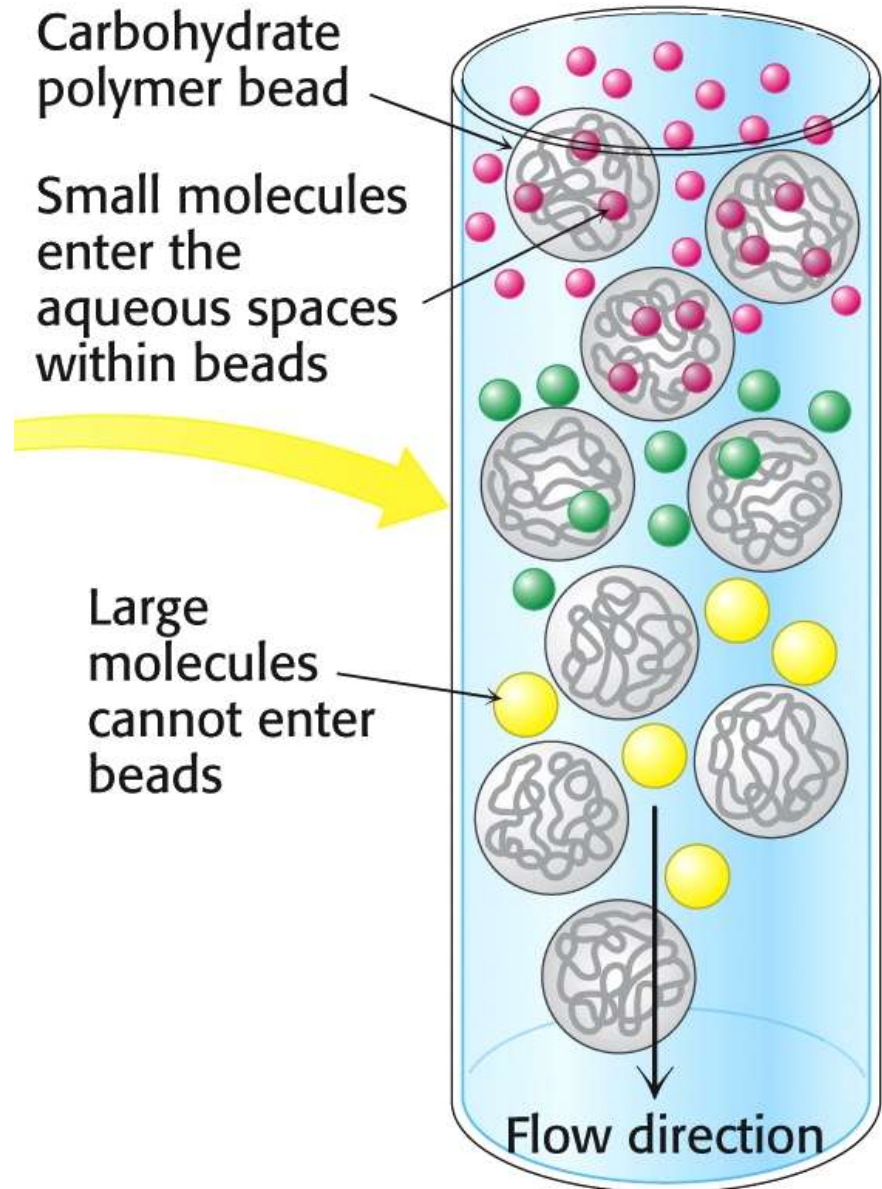
Uso comune: separazione di lipidi o piccole molecole



Column chromatography



Cromatografia per gel filtrazione

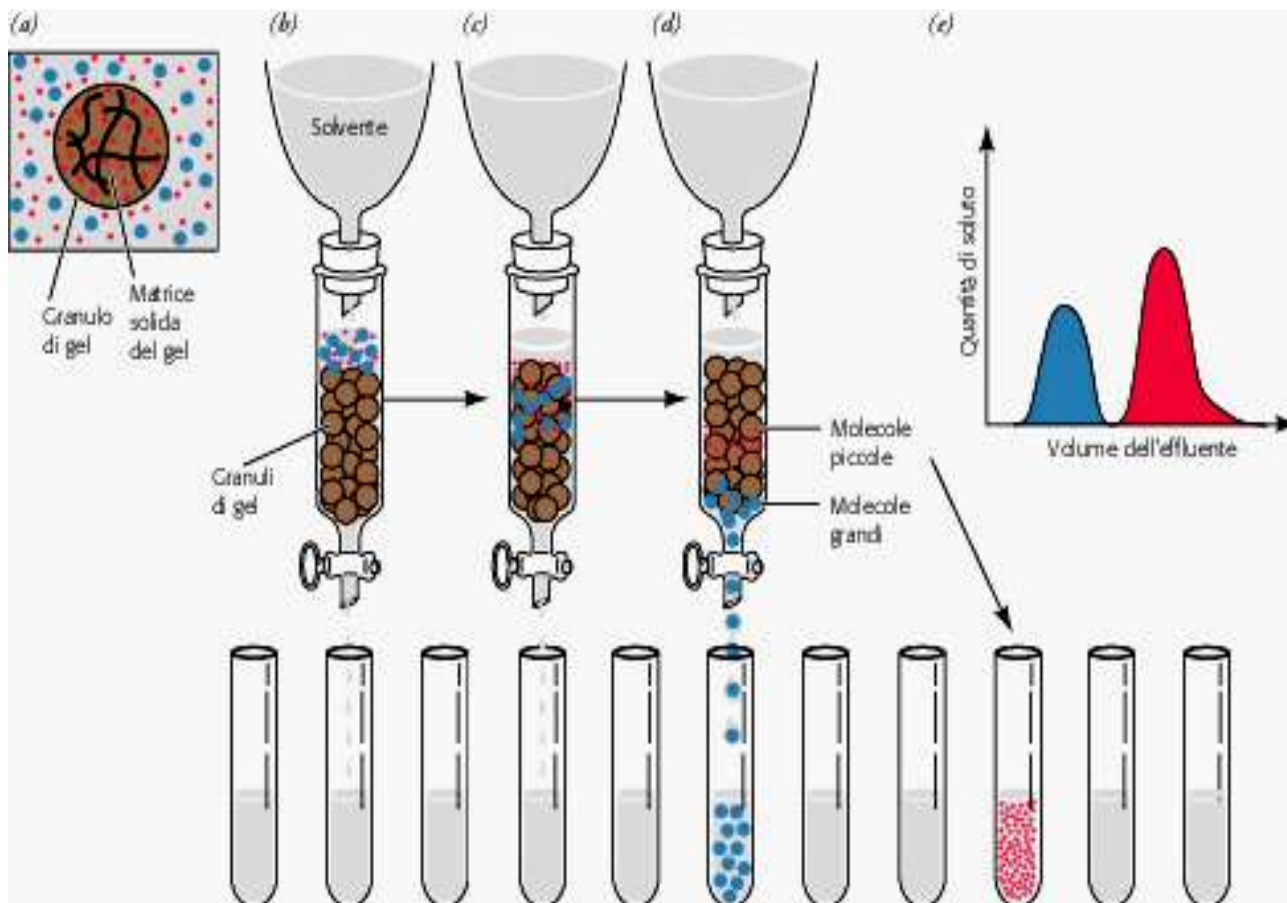


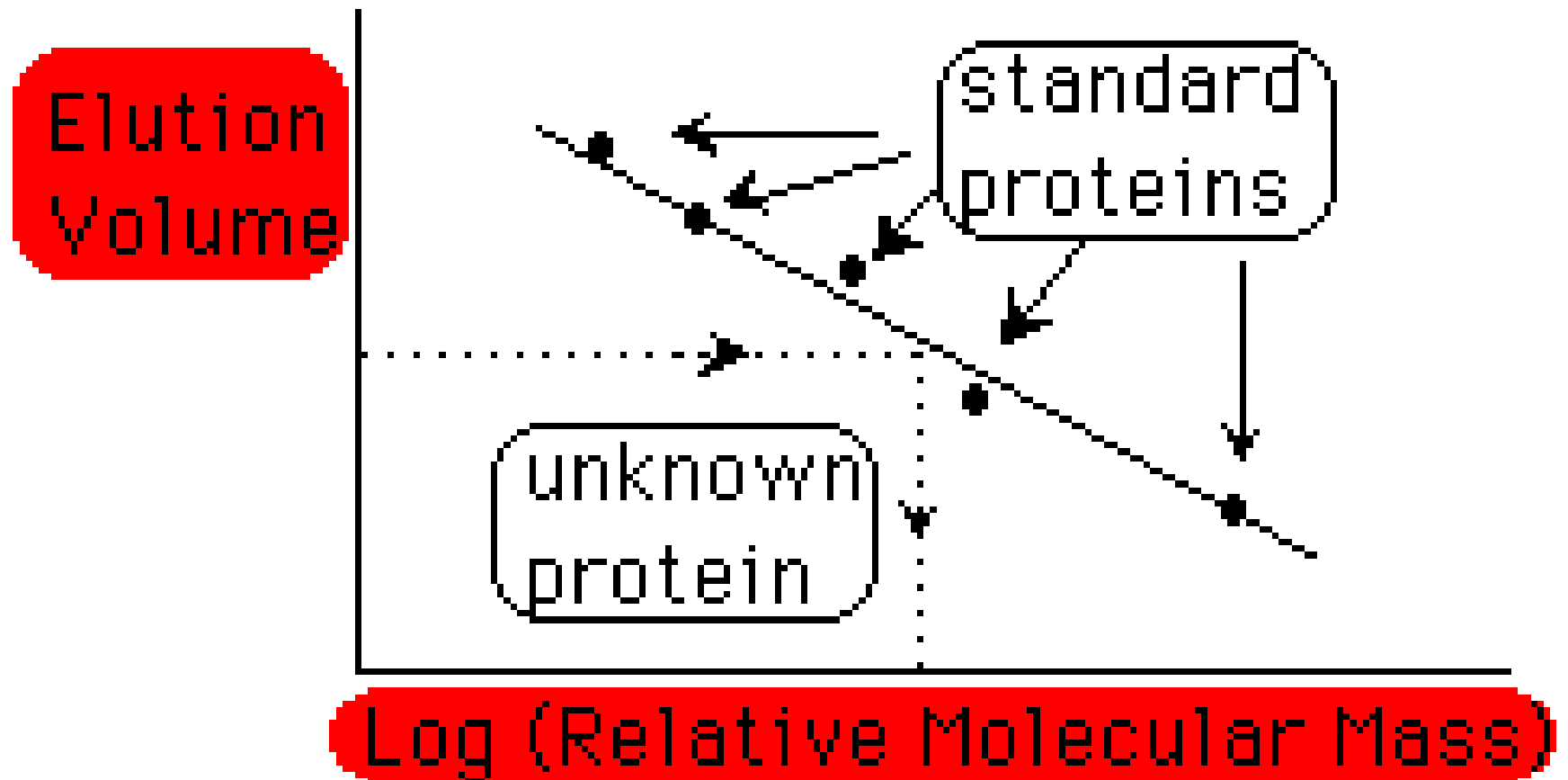
Cromatografia **per gel filtrazione**

Fase stazionaria : granuli di gel

Fase mobile: solventi acquosi

Uso comune: separazione di proteine o acidi nucleici





Cromatografia **per affinità**

Fase stazionaria : granuli di resina coniugata al ligando

Fase mobile: solventi acquosi

Uso comune: separazione di proteine



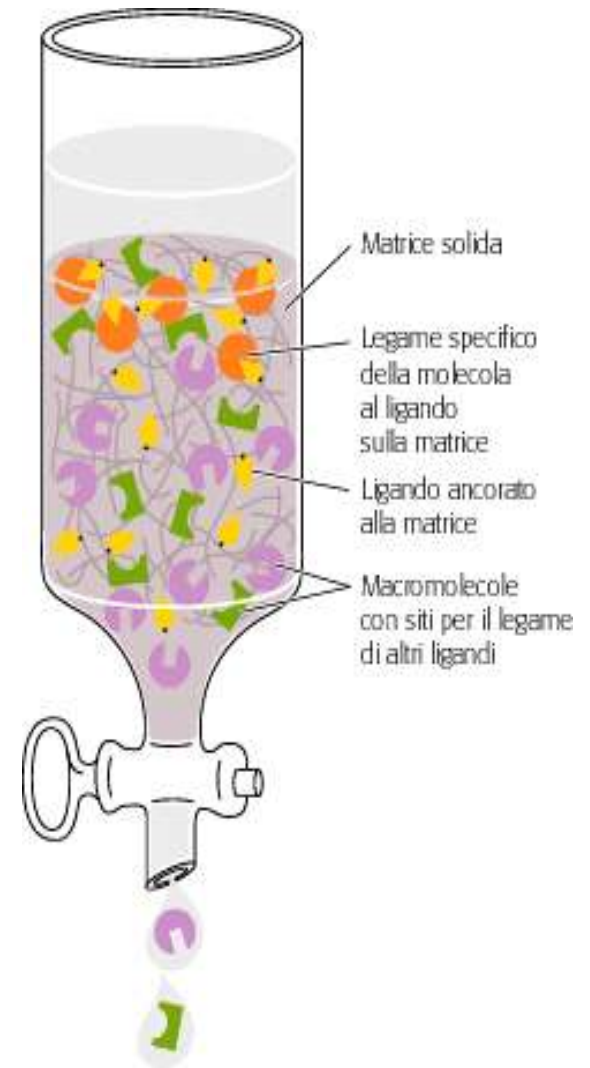
molecola A



Ligando
specifico per la
molecola A

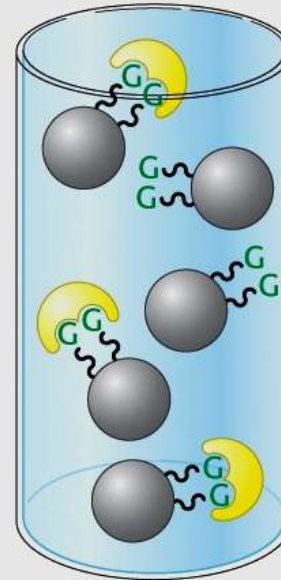


Altre molecole
non affini al ligando

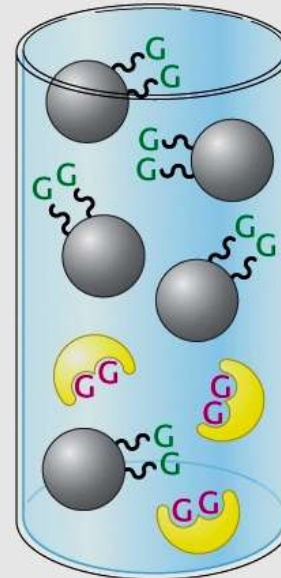


Cromatografia per affinità

Glucose-binding protein attaches to glucose residues (G) on beads



Addition of glucose (G)



Glucose-binding proteins are released on addition of glucose

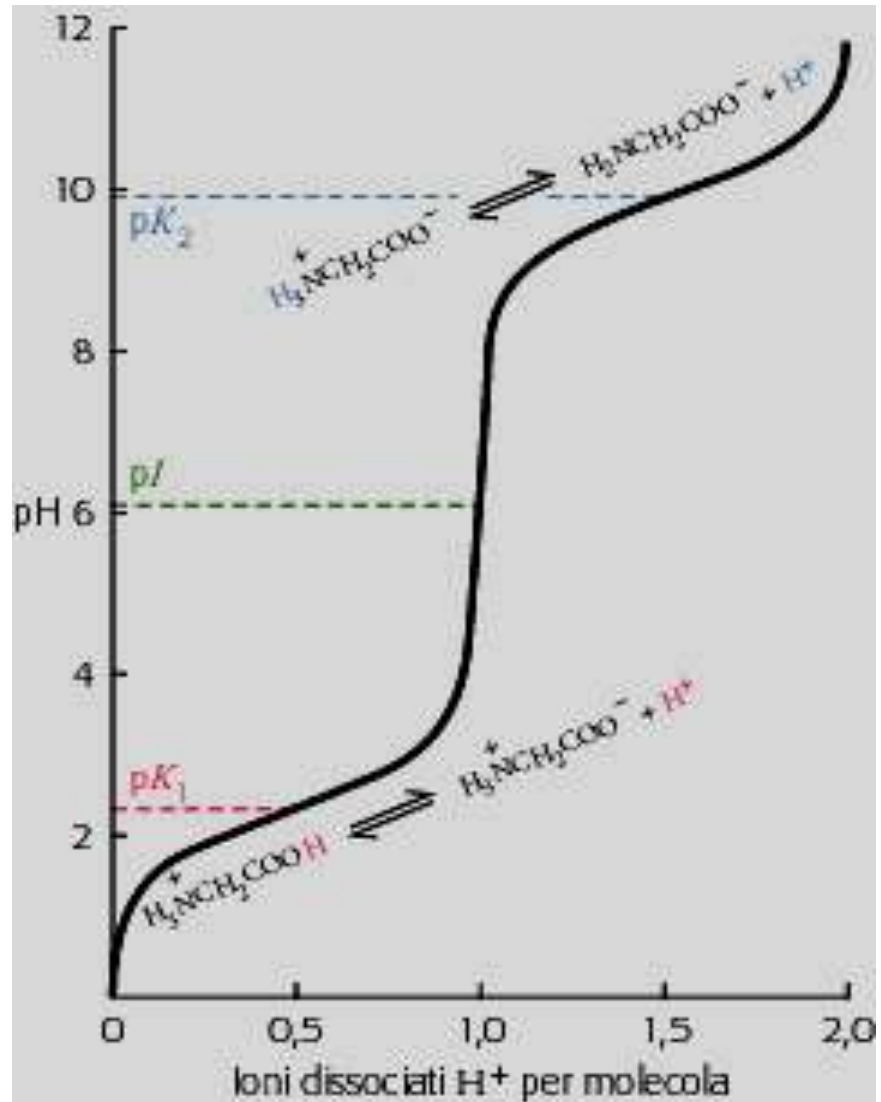
Ligandi comunemente usati in cromatografia per affinità :

- Anticorpi specifici
- Proteina A o G
- Substrati
- Cofattori
- Metalli

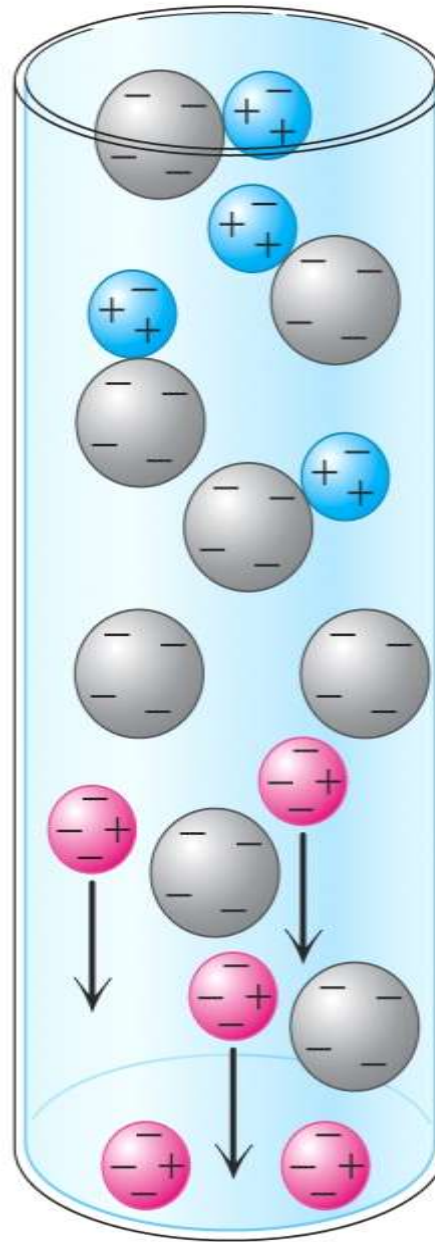
L'eluizione della proteina legata può avvenire **per competizione** o **variando le condizioni** di forza ionica o di pH

Come gli aminoacidi, anche le proteine hanno un **punto isoelettrico**

A pH vicino alla neutralità alcune proteine si comportano come anioni, altre come cationi ed altre ancora sono neutre.



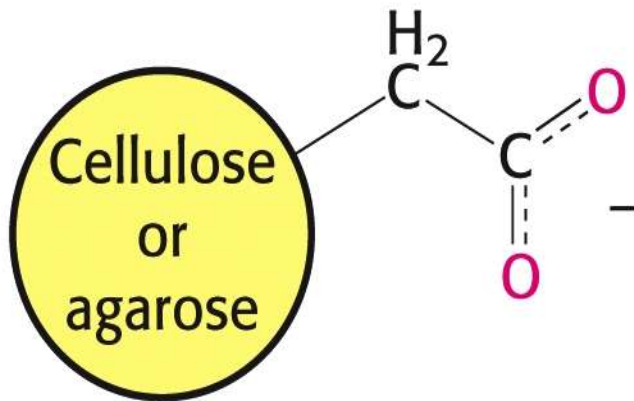
Cromatografia a scambio ionico



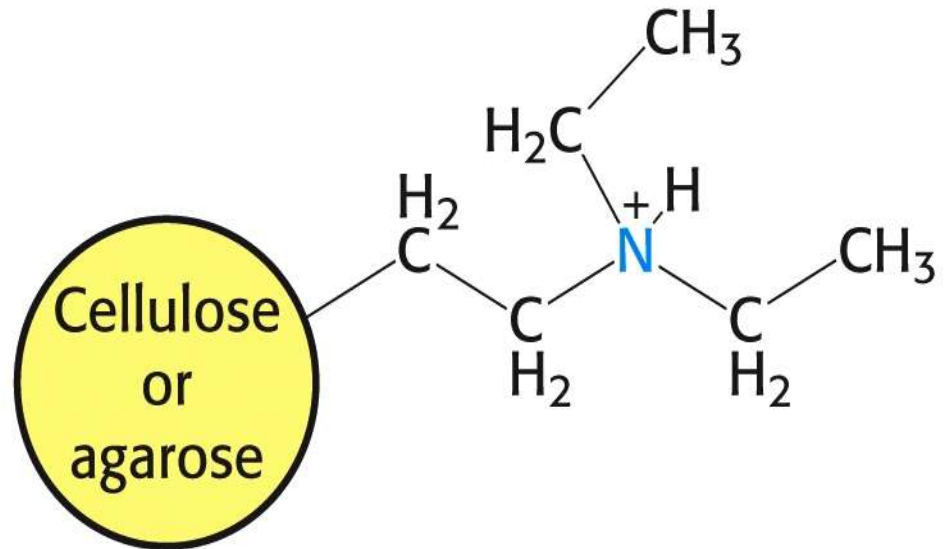
Positively charged
protein binds to
negatively charged
bead

Negatively charged
protein flows
through

Cromatografia a scambio ionico



**Carboxymethyl
(CM) group**
(ionized form)



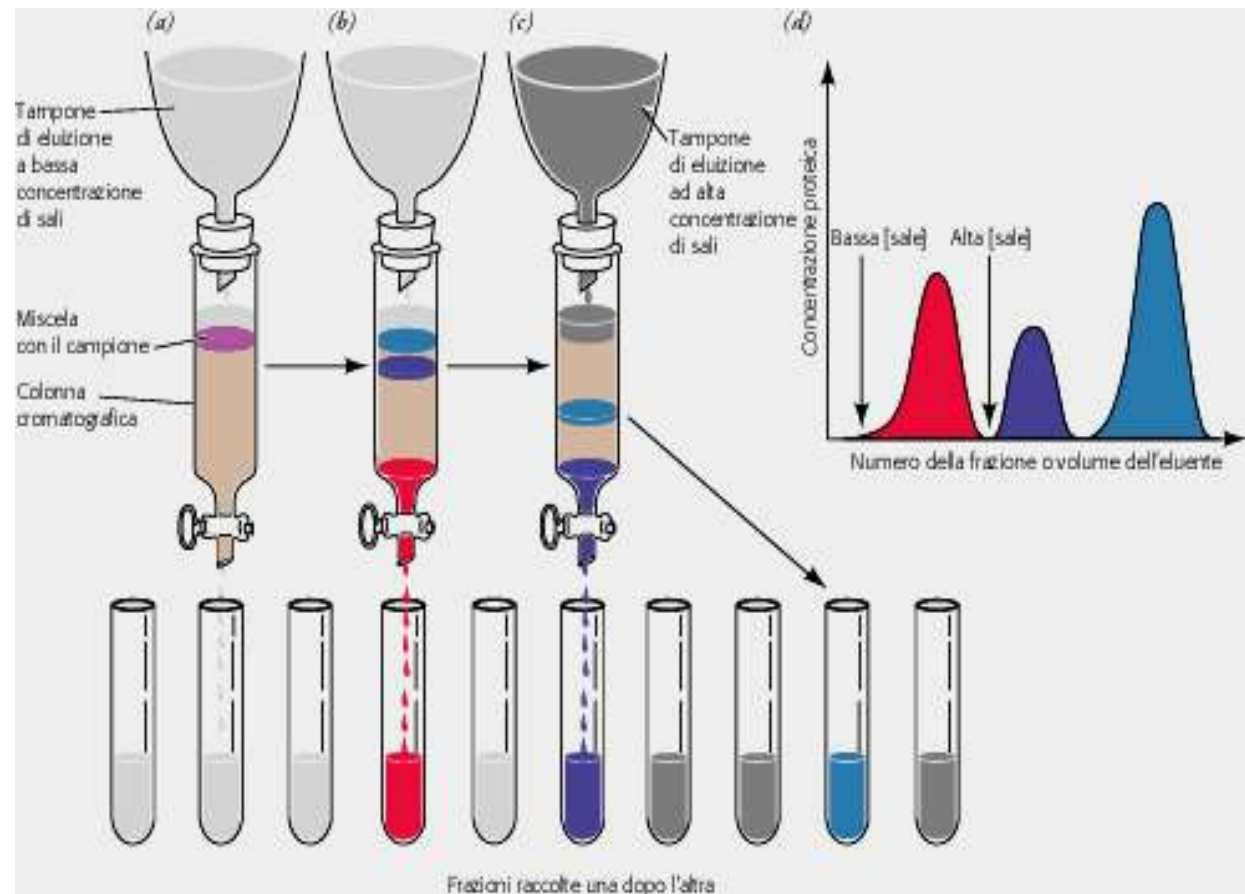
**Diethylaminoethyl
(DEAE) group**
(protonated form)

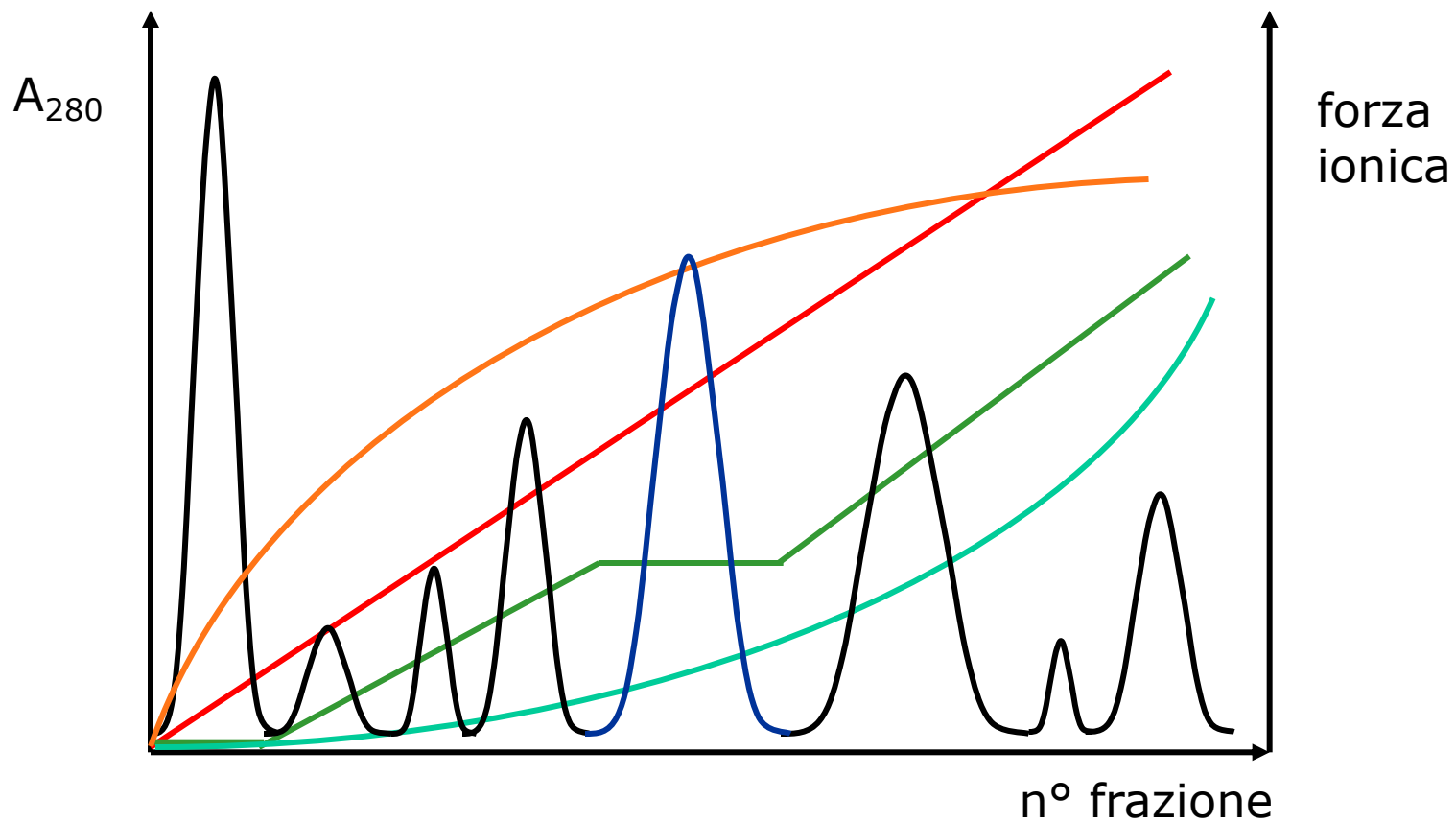
Cromatografia a scambio ionico

Fase stazionaria : palline di vetro rivestite di cellulosa (scambiatore anionico o cationico)

Fase mobile: solventi acquosi

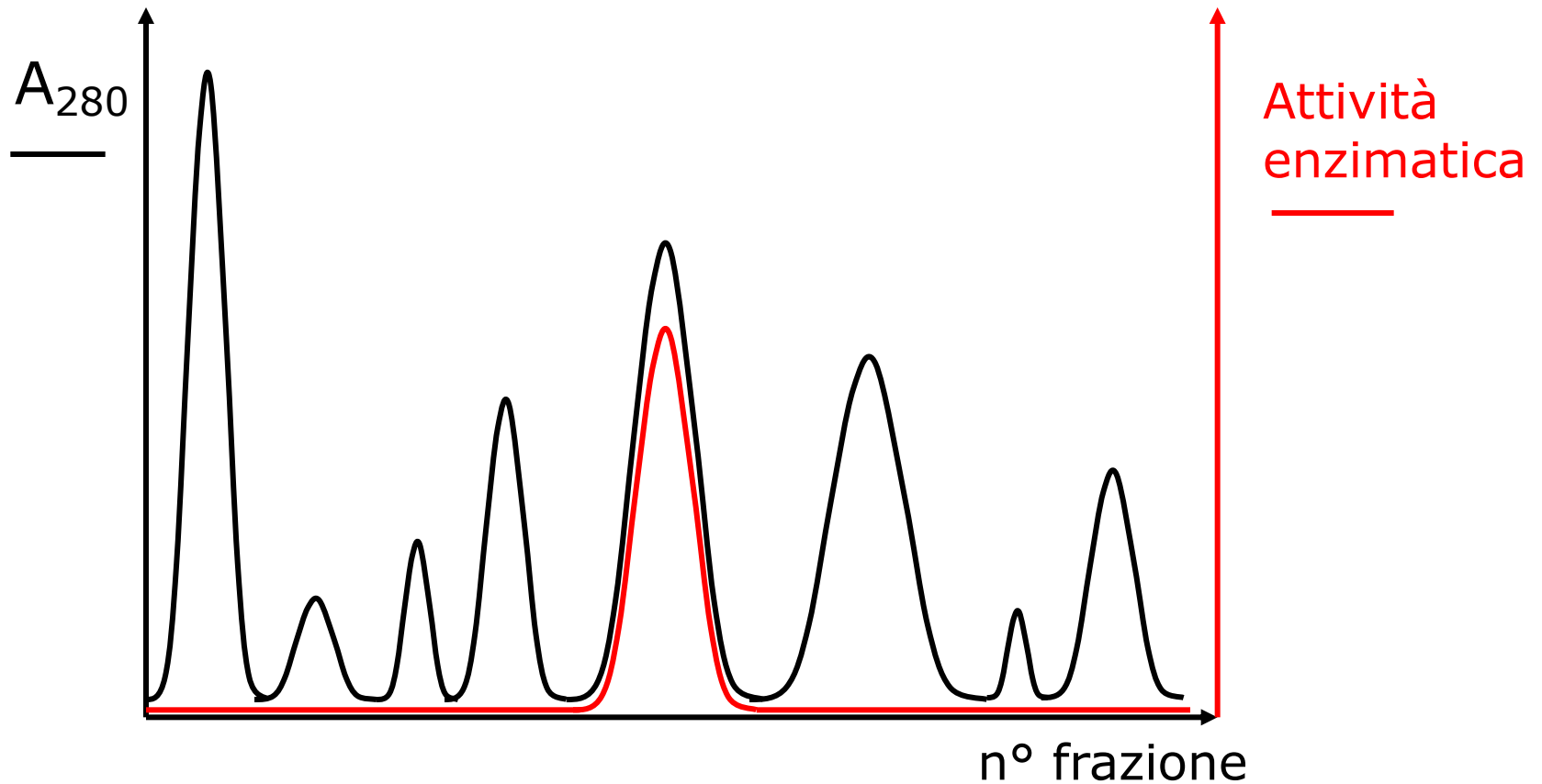
Uso comune: separazione di proteine





- Gradiente continuo lineare
- Gradiente continuo concavo
- Gradiente continuo convesso
- Gradiente discontinuo

Individuazione delle frazioni contenenti l'enzima da purificare



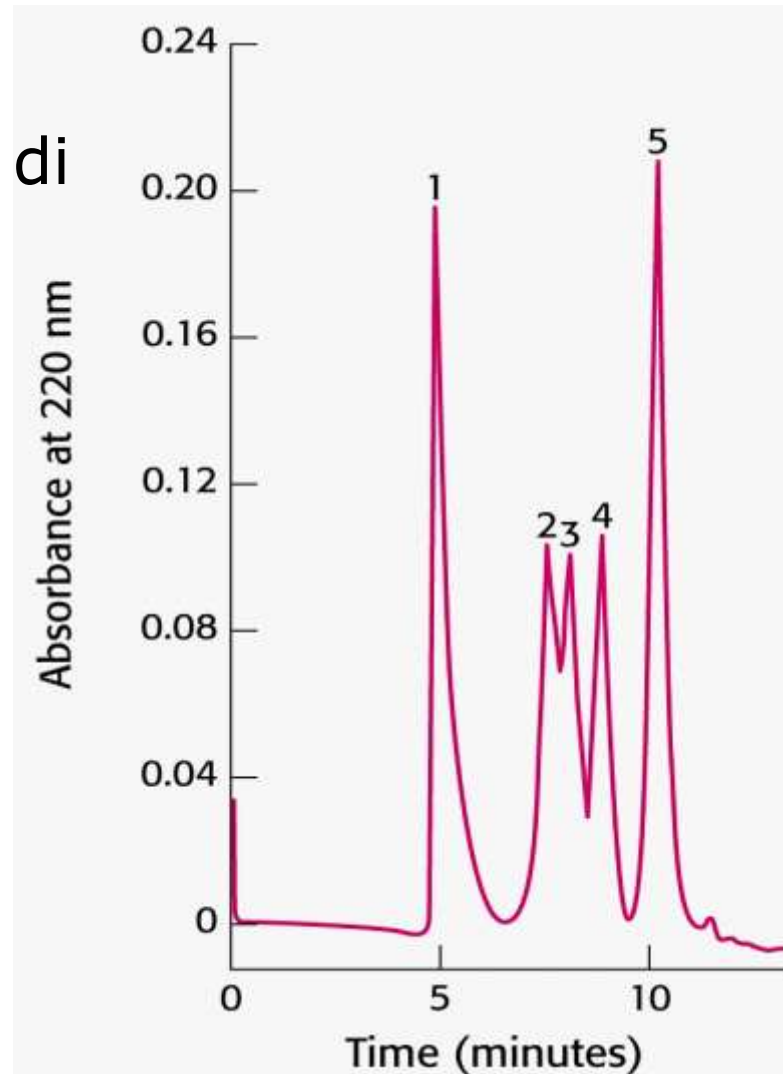
Cromatografia liquida veloce di proteine (FPLC)

Vantaggi :

- Velocità di esecuzione
- Riproducibilità delle condizioni di separazione
- Semi-automaticità del procedimento

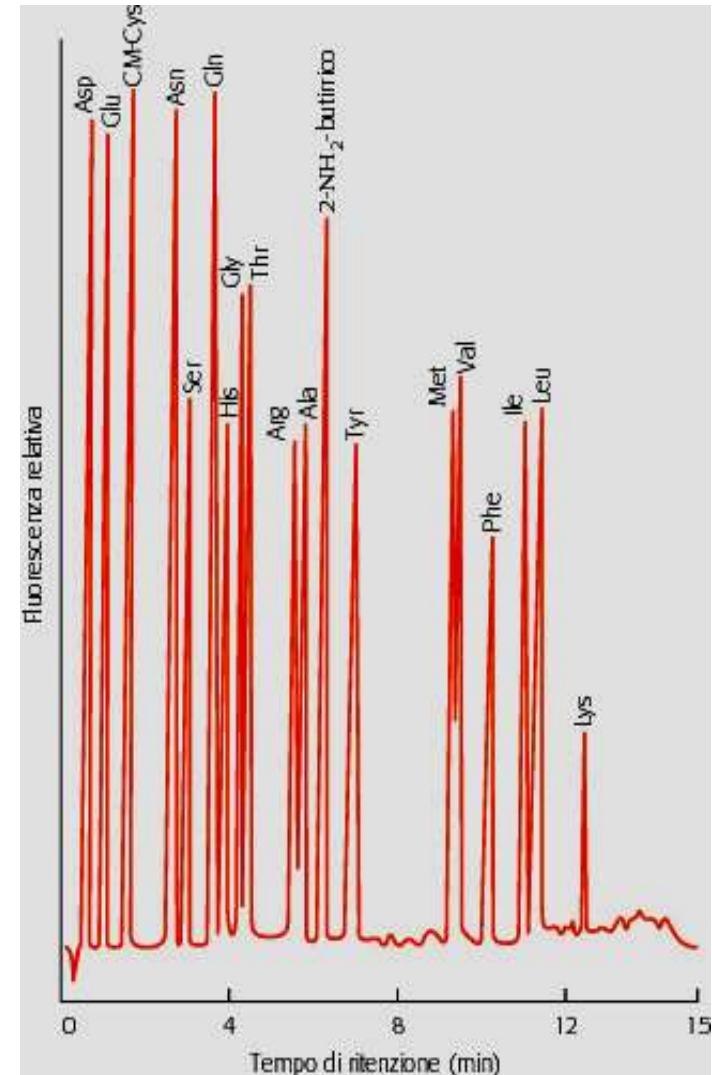
Svantaggi :

- Costo degli apparati
- Utilizzabile in purificazioni su scala di laboratorio



Cromatografia liquida ad alta risoluzione (HPLC)

L'alta pressione consente di utilizzare matrici estremamente fini e quindi, aumentando il numero di interazioni con la matrice, di aumentare il numero di patti teorici. Consente di analizzare quantitativamente e qualitativamente miscele di molecole piccole derivatizzate, rispetto a composti di riferimento





Cromatografia liquida ad alta risoluzione (**HPLC**)

Vantaggi :

- Velocità di esecuzione
- Riproducibilità della separazione
- Semi-automaticità del procedimento

Svantaggi :

- Costo degli apparati e delle colonne
- Utilizzabile per analisi o in purificazioni su piccola scala di laboratorio

Cromatografia gas-liquido (GLC)

Consente di analizzare quantitativamente e qualitativamente miscele di molecole piccole a bassa polarità, rispetto a composti di riferimento

Vantaggi :

- Elevata sensibilità
- Riproducibilità della separazione
- Semi-automaticità del procedimento

Svantaggi :

- Costo degli apparati e delle colonne
- Utilizzabile per analisi
- **Non consente purificazione**, poiché il campione viene vaporizzato prima della corsa e poi rivelato ad alte temperature