

# CROMATOGRAFIA DI ESCLUSIONE

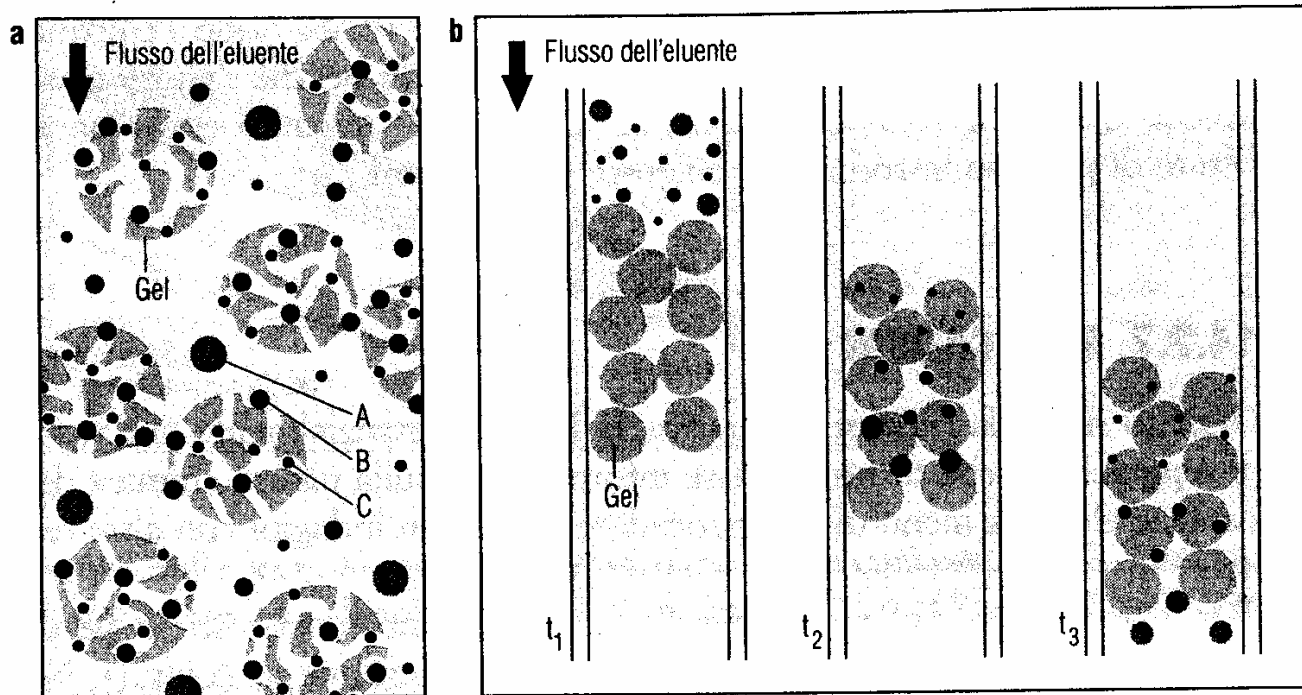
La **cromatografia di esclusione** (*Size Exclusion Chromatography, SEC*) permette di separare i componenti di una miscela **in base alle dimensioni molecolari**

In genere la **fase stazionaria** è un polimero in forma di **gel**; la **fase mobile** può essere un **solvente organico**, e in tal caso si parla di *Gel Permeation Chromatography* (GPC), oppure **acqua** o una soluzione tampone, e si parla di *Gel Filtration Chromatography* (GFC).

La **cromatografia di esclusione a bassa pressione** (LP-SEC) viene usata soprattutto in campo biologico, per isolare macromolecole da matrici molto complesse

# MECCANISMI DI AZIONE

Durante l'eluizione le molecole della miscela possono penetrare nelle particelle di gel solo se sono più piccole della luce dei pori e quindi vengono trattenute per tempi diversi secondo le loro dimensioni. **Le molecole più grosse** vengono addirittura «**escluse**» dal gel e quindi attraversano la colonna insieme all'eluente, alla sua stessa velocità.



Rispetto a un determinato gel, le molecole di una miscela possono avere tre diversi comportamenti:

1. le molecole che hanno dimensioni tali da non poter penetrare nei pori sono *escluse* dal gel;
2. alcune molecole possono penetrare in parte nei pori di gel, occupando solo una frazione del volume interno e perciò vengono *frazionate*;
3. le molecole di dimensioni minori di quelle dei più piccoli pori del gel possono penetrare in tutto il volume interno e quindi sono completamente *permeate* dal gel.

Il **volume morto** ( $V_0$ ) è il volume di colonna non occupato dalle particelle del gel; viene anche detto **volume interparticelle** o **volume interstiziale** o **volume esterno** ( $V_e$ ) o ancora **volume vuoto** (in inglese, *void volume*).

Il **volume interno** ( $V_i$ ) è il volume dei pori presenti nelle particelle di gel; viene anche detto **volume intraparticelle** o **volume intrastiziale** o **volume della fase stazionaria** ( $V_s$ ).

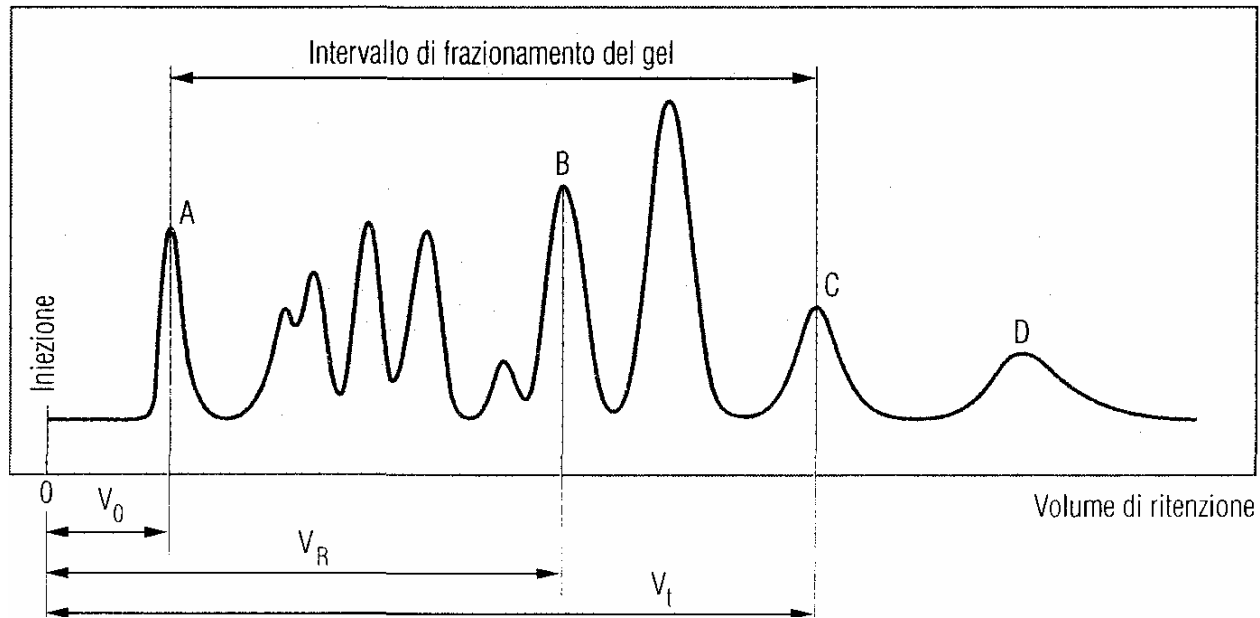
Il volume totale della fase mobile in colonna o semplicemente **volume totale** ( $V_t$ ) è tutto il volume a disposizione delle particelle della miscela, cioè:

$$V_t = V_0 + V_i$$

Il **volume di ritenzione** ( $V_R$ ), detto anche **volume di eluizione** ( $V_e$ ), è il volume di fase mobile eluita dal momento dell'ingresso fino all'uscita dalla colonna di una determinata sostanza. Tale volume **viene misurato in corrispondenza del massimo del relativo picco cromatografico**

Il **volume di ritenzione corretto** ( $V'_R$ ) viene definito in modo del tutto analogo a quello per le altre tecniche cromatografiche:

$$V'_R = V_R - V_0$$



$$V_R = V_0 + K_0 V_i$$

$K_0$  è una costante di distribuzione (0÷1) che esprime la frazione del volume dei pori ( $V_i$ ) accessibile alle molecole di una determinata sostanza.

Ricavando  $K_0$  dalla precedente equazione si ottiene:

$$K_0 = \frac{V_R - V_0}{V_i} = \frac{V'_R}{V_i}$$

La costante  $K_0$  può dunque essere misurata in base al tracciato cromatografico!

Poiché:  $V_i = V_t - V_0$

$$K_0 = \frac{V_R - V_0}{V_t - V_0}$$

D??

## Altri parametri

- il **volume del polimero** ( $V_p$ , ma anche  $V_s$  o  $V_m$ ) della matrice di gel, che è inaccessibile alle molecole della miscela da separare;
- il **volume geometrico totale della colonna** ( $V_c$ ), che a volte viene anche indicato con lo stesso simbolo previsto dalla iupac per il volume totale (cioè  $V_t$ ).

$$V_c = V_0 + V_i + V_p$$

$$K_{av} = \frac{V_R - V_0}{V_c - V_0}$$

$$K_0 = K_{AV} \left( 1 + \frac{V_p}{V_i} \right)$$

# PROPRIETÀ E PRESTAZIONI DEI GEL PER SEC

## Proprietà dei gel

### Limite di esclusione

Esprime la massa molare della più piccola molecola che viene esclusa dai pori di gel.

### Limite di permeazione

Esprime la massa molare della più grande molecola che può penetrare in tutto il volume interno del gel

### Intervallo di frazionamento

Intervallo delle masse molari delle molecole che vengono frazionate dal gel

### Distribuzione dei pori

Le dimensioni dei pori di un determinato gel non sono tutte uguali, ma si distribuiscono entro un intervallo

Le particelle di gel possono essere di forma irregolare oppure sferica; quella **sferica**, ovviamente, è la forma **ideale**

La qualità della separazione è tanto **migliore** quanto più **ristretto** è l'intervallo in cui si distribuiscono le dimensioni delle particelle

In genere, si usano granulometrie da 100 a 200 mesh, ma anche fino a 400 mesh

Il gel viene preparato miscelando il polimero disidratato con un solvente opportuno; questo comporta una espansione del polimero e quindi un **rigonfiamento** delle particelle. La quantità di solvente assorbita per ogni grammo di gel secco dipende dalla dimensione dei pori.

# Prestazioni

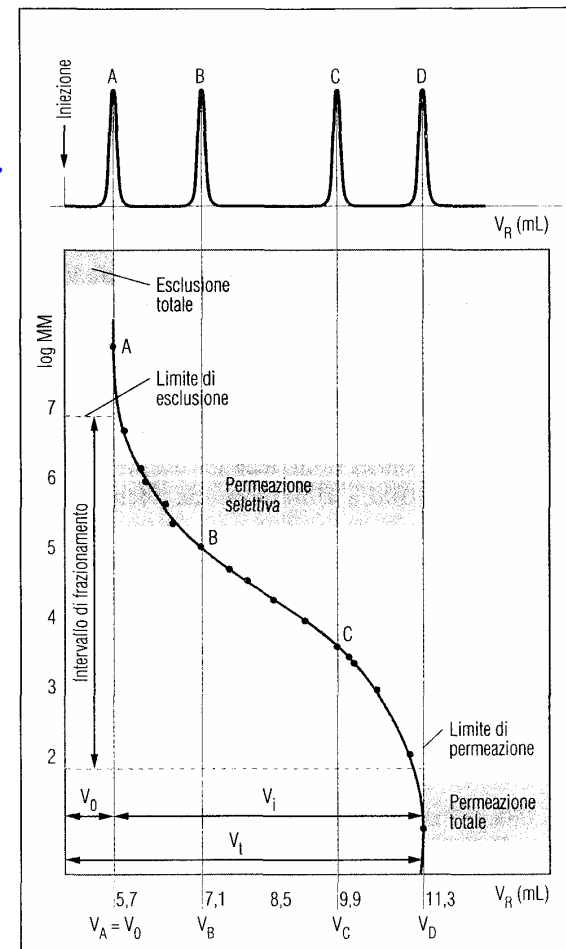
**selettività** esprime la capacità del gel di separare molecole con diversa massa molare

**efficienza** 
$$H = A + \frac{B}{u} + C\bar{u}$$

In genere il primo termine (A) è quello preponderante. D'altra parte, il secondo termine (B) prevale sul terzo (C) nel caso di piccole molecole (come gli aminoacidi), mentre risulta praticamente trascurabile nel caso di macromolecole (come le proteine).

## Risoluzione

Viene valutata, come di consueto, in base alla differenza fra i volumi di ritenzione tenendo conto dell'ampiezza dei picchi.



# FASE STAZIONARIA

I gel sono di vari tipi: *morbidi, semirigidi e rigidi.*

Polimeri a base di **destrano** (Sephadex)

Polimeri a base di **agarosio** (Sepharose, BioGel A)

Polimeri a base di **poliacrilammide** (BioGel P)

Polimeri a base di **destrano copolimerizzato con N.N'-metilenbis-acrilammide** (Sephacryl).

Polimeri a base di **stirene-divinilbenzene** (BioBeads-X)

# Fase Mobile

Si possono usare **soluzioni acquose saline** oppure **solventi organici**.

Nella preparazione delle soluzioni saline occorre tenere sotto controllo i seguenti fattori:

In alcuni tipi di gel, soprattutto se la quantità di campione immessa in colonna è piccola, la presenza di ioni inorganici può accentuare la capacità di scambiare ioni da parte dei gruppi funzionali presenti nella matrice del gel. Per questo motivo in genere si preparano soluzioni di cloruro di sodio con forza ionica maggiore di 0,02 (fino a 0,05, in alcuni casi).

Alcune separazioni devono essere eseguite a pH ben determinati. E ogni gel ha un ben preciso campo di applicazione, al di fuori del quale possono verificarsi idrolisi o modificazioni della struttura del polimero.

Gli agenti ossidanti devono essere evitati, perché causano modificazioni nella struttura dei polimeri.

Per evitare la formazione di bolle nella colonna, i gas disciolti nell'eluente (soprattutto  $\text{CO}_2$ ) devono essere eliminati.

Quando le sostanze ottenute dalla separazione devono essere successivamente liofilizzate o essiccate, si usano eluenti volatili (piridina, acido acetico, acido formico) e sali che danno prodotti volatili nell'equilibrio di solubilizzazione (formiato di ammonio, idrogenocarbonato di ammonio).

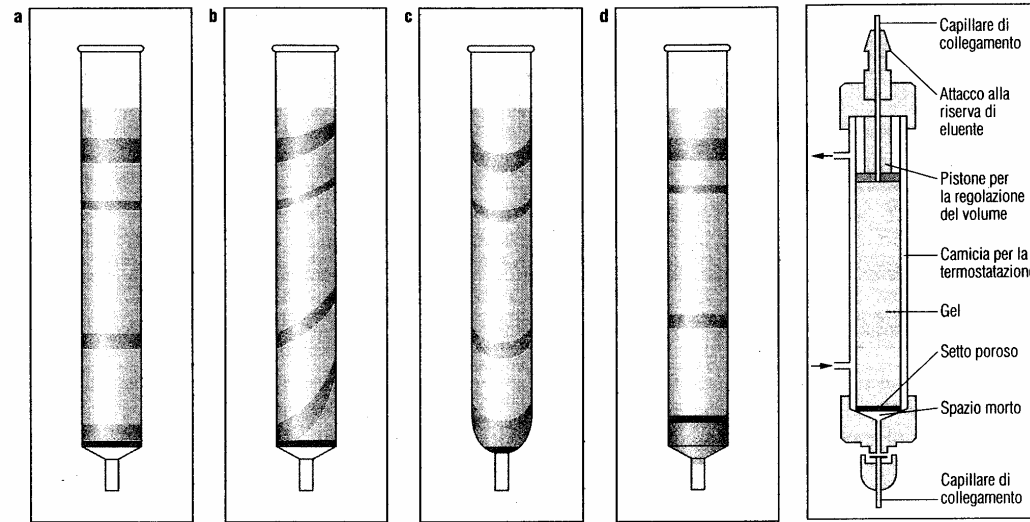
I solventi organici non sono compatibili con tutti i tipi di gel.

# CRITERI PER LA SCELTA DEL GEL, DELLA COLONNA E DEL FLUSSO DELL'ELUENTE

**Scelta del gel.** Si devono considerare i seguenti fattori:

- il **tipo di separazione** che si intende effettuare (suddivisione in due o più frazioni o gruppi);
- l'**intervallo di frazionamento** del gel;
- l'**intervallo di distribuzione** delle masse molari dei componenti del campione.

**Scelta della colonna.** Le colonne per SEC sono di vetro borosilicato oppure di plastica (trasparente e inerte), con elevata resistenza meccanica



I volumi morti, prima e dopo la colonna, devono essere minimi (max 0,1% del volume del gel), per evitare che il campione o la banda in uscita si diffondano o si diluiscano

I setti porosi che sostengono la colonna devono essere di materiale plastico (Dacron, Teflon, Nylon) sinterizzato. I tubi in entrata e in uscita devono essere calibrati per ridurre i fenomeni di diluizione del campione e delle bande.

Infine, se la temperatura influisce in modo determinante sulla separazione, la colonna deve essere dotata di una camicia in cui far scorrere acqua o altri fluidi per la termostatazione.

Per ottimizzare selettività, risoluzione ed efficienza di una colonna, si deve ottimizzare il rapporto lunghezza/diametro, caso per caso, in relazione alla quantità di miscela da separare. Infatti, colonne di gel troppo corte, o di volume esiguo, possono causare separazioni incomplete; viceversa, colonne troppo lunghe o di volume eccessivo possono causare diluizioni eccessive delle bande in uscita. In genere per separare una miscela in due sole frazioni, si usa un **rapporto lunghezza/diametro che varia da 5 a 10**, mentre il volume di gel può variare **da 4 a 10 volte il volume del campione**. Per la separazione frazionata il rapporto lunghezza/diametro, e anche il volume di gel rispetto a quello del campione, possono variare da 50 a più di 100.

**Scelta del flusso.** In genere la risoluzione diminuisce all'aumentare del flusso di eluente. Le migliori risoluzioni, dunque, si ottengono con colonne lunghe e flusso molto basso, mentre per ottenere separazioni veloci si devono usare colonne corte e flussi elevati.

# CROMATOGRAFIA DI SCAMBIO IONICO IEC

La **cromatografia di scambio ionico** (*Ion Exchange Chromatography, IEC*) permette di separare i componenti a carattere ionico di una miscela

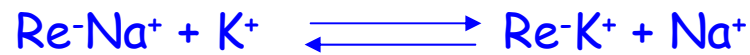
**scambiatori ionici**, resine polimeriche sul cui scheletro molecolare sono agganciati gruppi funzionali con carica elettrica

resina cationica

resina anionica

# MECCANISMI DI AZIONE

La separazione dei diversi componenti ionici sono dovute alla distribuzione di ciascuno fra le due fasi, mobile (in genere, una soluzione tampone) e stazionaria (la resina a scambio ionico).

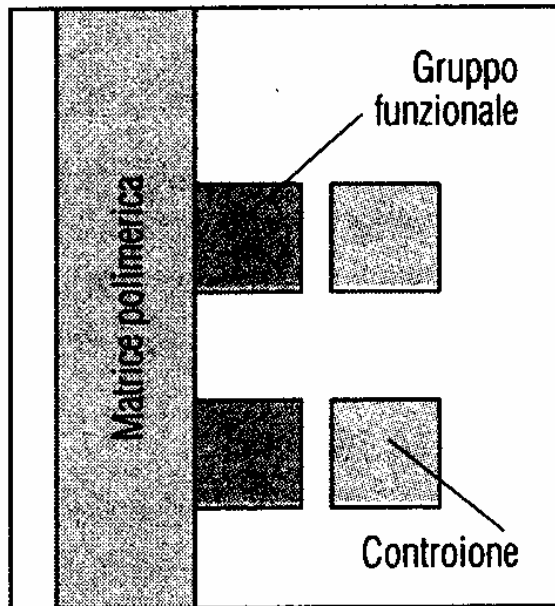


**coefficiente di selettività**  $k_{\text{K/Na}} = \frac{[\text{Re-K}^+][\text{Na}^+]}{[\text{Re-Na}^+][\text{K}^]}$

La migrazione di  $\text{K}^+$  avviene dunque per effetto di una successione di fenomeni di adsorbimento-desorbimento sui gruppi attivi della resina.

$$[ ] = C \quad k_{\text{K/Na}} = \frac{C_{\text{S(K)}} C_{\text{M(Na)}}}{C_{\text{S(Na)}} C_{\text{M(K)}}} \quad k_{\text{K/Na}} = \frac{K_{\text{c(K)}}}{K_{\text{c(Na)}}} \quad k_{\text{A/B}} = \frac{K_{\text{c(A)}}}{K_{\text{c(B)}}} = \alpha_{\text{A/B}}$$

# PROPRIETÀ E PRESTAZIONI DELLE RESINE A SCAMBIO IONICO

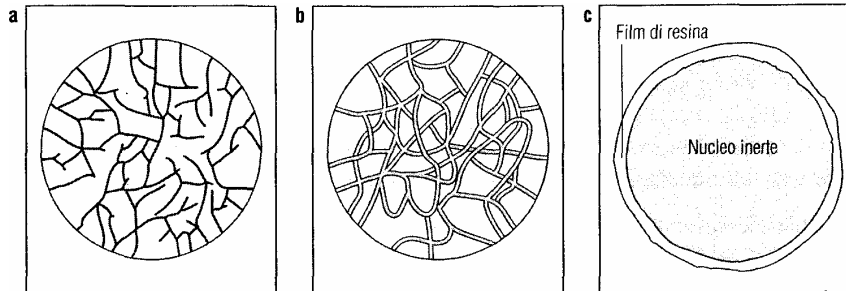


Le proprietà chimico-fisiche di queste resine dipendono dai seguenti fattori:

- composizione e struttura della matrice;
- natura e forza di scambio dei gruppi funzionali;
- natura (acida, basica o neutra) del controione;
- granulometria;
- *capacità di rigonfiamento*;
- *capacità di scambio*;
- inerzia chimica e termica.

# Composizione e struttura della matrice

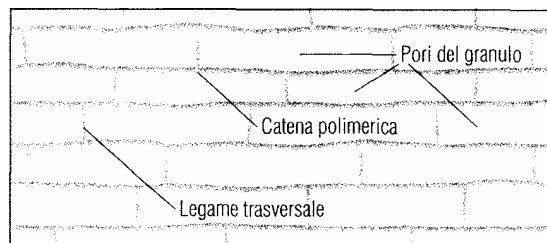
La matrice della resina è costituita da polimeri organici con diverso grado di reticolazione oppure da composti inorganici cristallini o amorfi. Può avere una struttura microporosa **a** o macroporosa **b** oppure può essere depositata come film sopra un supporto sferico inerte **c**



Le **resine microreticolari** (con pori piccoli) hanno un elevato grado di reticolazione, che lascia appunto piccoli spazi liberi; quando sono idratate, formano gel.

Le **resine macroreticolari** (con pori grandi fino ad alcune centinaia di angstrom) hanno un minore grado di reticolazione; sono adatte all'uso con solventi organici.

Le **resine pellicolari**, sono formate da grani di vetro rivestiti da un film di resina; in alcuni casi, tra il nucleo di vetro e la resina c'è uno strato di gel di silice.



Nel caso di matrici polimeriche organiche, la porosità dei grani dipende dal numero di legami trasversali fra le catene polimeriche

# Natura e forza di scambio dei gruppi funzionali

I gruppi funzionali forti o deboli secondo la forza del gruppo acido (o basico).

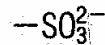
Tabella 14.2

Gruppi funzionali tipici di resine a scambio ionico

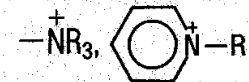
Acidi

Basici

forti



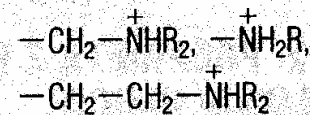
forti



deboli



deboli



## Natura del controione

H<sup>+</sup> forma acida

Na<sup>+</sup> forma sodica

OH<sup>-</sup> forma basica

# Granulometria

Le particelle di resina devono essere di forma sferica e di dimensioni uniformi e devono avere una stretta distribuzione granulometrica.

Poiché l'idratazione comporta un rigonfiamento anche molto sensibile delle particelle, la granulometria viene espressa sia in termini di **dry mesh** (dm), per la resina a secco, sia di **wet mesh** (wm), per la resina idratata.

# Capacità di rigonfiamento

I polimeri più reticolati (e quindi più porosi) possono assorbire una maggiore quantità di acqua (o altri solventi) rispetto ai polimeri meno reticolati; inoltre, il grado di imbibizione dipende anche dalla natura più o meno idrofila dei gruppi funzionali.

La **capacità di rigonfiamento** dipende anche dal solvente in cui viene preparata la resina e, in particolare, dalla forza ionica (per soluzioni acquose).

A valori elevati di forza ionica, le resine poco reticolate si deformano facilmente in seguito a fenomeni di natura osmotica.

# Capacità di scambio

Quantità di campione che può essere separata in una determinata colonna

Espressa in meq/g di resina a secco (ECD) o di resina idratata (ecv)

- **capacità totale**, che dipende dal numero di gruppi funzionali carichi complessivamente presenti per grammo di resina secca;
- **capacità disponibile**, che dipende dalla effettiva accessibilità dei gruppi funzionali e viene misurata in condizioni sperimentali definite in modo opportuno.

# Inerzia chimica e termica

Le resine devono essere stabili alle temperature di esercizio. Inoltre, non devono dare luogo a interazioni indesiderate (diverse cioè dallo scambio ionico) con i solventi (in genere soluzioni tampone o miscele acqua/alcol) o con le specie da separare. È importante verificare l'intervallo di pH entro cui è possibile lavorare senza che la fase stazionaria si degradi.

# Prestazioni

In una colonna per IEC, il valore di  $K_c$  (o meglio di  $k$  o  $\alpha$ ) per ciascuna specie ionica dipende dai seguenti fattori:

- natura e forza della resina;
- forma (cationica o anionica) e grado di rigonfiamento della resina;
- natura degli ioni da separare.

La forza con cui la resina trattiene gli ioni da separare dipende da diversi fattori:

- In soluzioni diluite ( $<0,1 M$ ), la selettività aumenta con la carica dello ione, cioè:



- Gli ioni più grossi sono trattiene di più
- Gli ioni che allo stato idratato hanno dimensioni più grandi sono trattiene meno di quelli più piccoli.
- La forza ionica, il pH e la presenza o meno di solventi organici nell'eluente influiscono sul grado di rigonfiamento della resina e quindi sul volume dei pori.
- L'interazione fra gli ioni e la fase stazionaria si indebolisce al crescere della temperatura e quindi la selettività diminuisce.

# Efficienza

Dipende dalle caratteristiche geometriche della colonna:

- Impaccamento
- Granulometria
- Distribuzione granulometrica
- Dimensioni dei pori
- Coefficiente di selettività
- Capacità di scambio della resina

Se  $k$  è grande, le bande di eluizione risultano strette e concentrate; viceversa, se  $k$  è piccola, le bande sono larghe e diffuse.



**Polimetacrilati** Dalla condensazione di acidi acrilici e acrilati si ottengono resine cationiche deboli (con gruppi —COOH).

**Polialchilenammine** Sono resine anioniche deboli o forti, secondo il grado di sostituzione dell'azoto amminico.

**Cellulosa** Contiene gruppi OH e COOH liberi e quindi è un sia pur debole scambiatore ionico. Questa proprietà viene potenziata legando ai gruppi OH dei gruppi funzionali opportuni

**Polimeri a base di destrano e agarosio** Sono i Sephadex e i Sepharose già descritti per la cromatografia di esclusione

**Scambiatori inorganici** Oltre ad argille e zeoliti, ricordiamo: fra gli scambiatori cristallini, il molibdofosfato di ammonio, e fra quelli amorfi il fosfato di zirconio.

**Gel di silice modificato** I gruppi funzionali vengono legati in modo covalente ai gruppi SiOH liberi sulla superficie del gel

# FASE MOBILE

In genere si usano soluzioni tampone acquose, eventualmente in miscela con metanolo in piccola percentuale. Per aumentare la competizione della fase stazionaria verso lo ione da eluire, si può aumentare la forza ionica dell'eluente. A questo scopo si usano sali neutri (come il nitrato e il perclorato di iodio). In alcuni casi, l'aggiunta di agenti complessanti può influire in modo decisivo sull'esito della separazione.

# CRITERI PER LA SCELTA DELLA FASE STAZIONARIA E DELLA FASE MOBILE

## Tipo di resina

La scelta non richiede particolari accorgimenti solo nel caso in cui gli ioni da separare siano di carattere «forte» (cioè se mantengono la stessa carica in un ampio intervallo di pH). Gli ioni con **carattere «debole»**, però, sono sensibili al **pH**, che quindi deve essere mantenuto **sotto controllo**

## Forza della resina

Le resine forti sono adatte a specie ioniche forti e deboli, mentre le resine deboli non trattengono le specie ioniche forti.

## Forma ionica

Il controione può essere determinante per la riuscita della separazione

## Purezza

E' consigliabile usare resine di grado analitico (sigla AG) e già nella forma ionica adatta per la separazione

# Granulometria

Deve essere scelta in base allo scopo della separazione cromatografica

**Tabella 14.4**

**Granulometria di resine a scambio ionico consigliata per i diversi campi applicativi**

Granulometria (mesh)	Applicazione
200-600	Separazioni comuni
100-200	Analisi quantitativa
50-10	Separazioni preparative
14-50	Usi industriali (addolcimento delle acque, e così via)

## Grado di reticolazione

In tabella si riportano i vantaggi e gli svantaggi legati all'uso di resine con diversa reticolazione (e quindi diverso diametro dei pori).

**Tabella 14.5**

**Effetti della reticolazione sulle proprietà di resine a scambio ionico**

Proprietà	Resine ad alta reticolazione*	Resine a bassa reticolazione**
Resistenza all'abrasione	+	-
Capacità della forma idratata	+	-
Capacità di rigonfiamento	-	+
Permeabilità alle macromolecole	no	sì

\* Per esempio resine stirene-divinilbenzene (DVB all'8%).

\*\* Resine stirene-divinilbenzene (DVB al 2%).

# Applicazioni

La IEC è una tecnica in espansione, usata per un numero crescente di applicazioni.

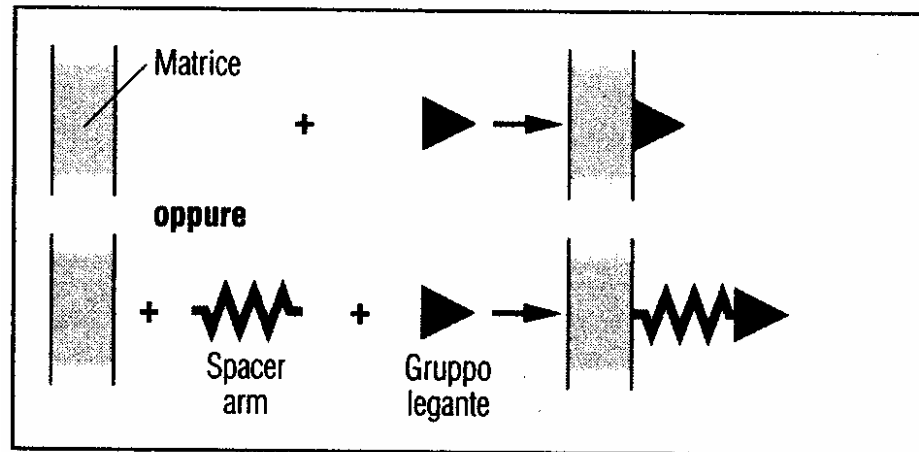
- **Addolcimento delle acque:** si eliminano gli ioni alcalino-terrosi e quelli dei metalli pesanti sostituendoli con ioni sodio.
- **Deionizzazione** (o demineralizzazione) delle acque: si fa passare l'acqua su una resina mista (cationica e anionica) in modo da sostituire tutti i cationi con ioni  $H^+$  e gli anioni con ioni  $OH^-$ .
- **Frazionamento di miscele che contengano composti organici e inorganici:** è il caso, per esempio, della rimozione di impurezze di tipo ionico da composti organici.
- Concentrazione di **metalli presenti in tracce** in soluzioni molto diluite.
- **Catalisi:** la resina può manifestare proprietà catalitiche verso alcune reazioni.
- **Conversione di un sale** da una forma a un'altra e salificazione di acidi e basi.
- **Separazione di miscele di tensioattivi** (anche non ionici).
- **Analisi di amminoacidi:** variando il pH, gli amminoacidi vengono eluiti in tempi diversi, secondo il  $pI$  di ciascuno.
- **Analisi di composti neutri mediante complessazione:** se un composto neutro forma un complesso con una specie ionica, può essere separato su resina a scambio ionico.
- **Separazione di molecole di grande massa molare** (peptidi, zuccheri, glucosidi, nucleotidi, enzimi, proteine): si può effettuare accoppiando il meccanismo dello scambio ionico con quello dell'esclusione.

# CROMATOGRAFIA DI AFFINITÀ

Affinity Chromatography, AFC

Tecnica di filtrazione selettiva usata in campo perlopiù biologico per purificare polisaccaridi, proteine, acidi nucleici, virus e anche cellule.

La fase stazionaria è una matrice polimerica reticolata, di solito un gel, attivata per inserimento di gruppi con proprietà leganti



Il legame con la matrice può anche avvenire tramite una catena idrocarburica di lunghezza opportuna (in inglese, *spacer arm*).

Con questa tecnica si possono separare piccole quantità di sostanze da matrici biologiche molto complesse oppure, se un materiale è parzialmente denaturato, si può separare la parte ancora attiva da quella denaturata.

### **Cromatografia di affinità con ioni metallici immobilizzati (IMAFIC).**

Sulla matrice viene immobilizzato un gruppo chelante a cui viene poi legato uno ione metallico.

Il composto di coordinazione che si forma può legare selettivamente proteine e peptidi che contengano istidina o cisteina

Il successivo desorbimento viene effettuato eluendo con soluzioni contenenti cloruro di ammonio o EDTA.

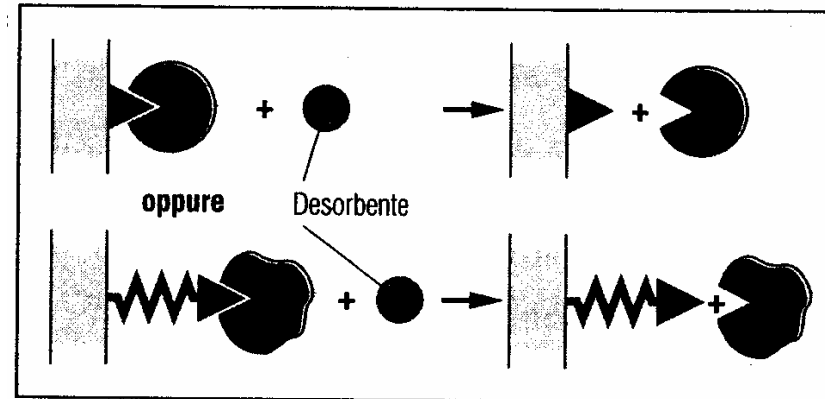
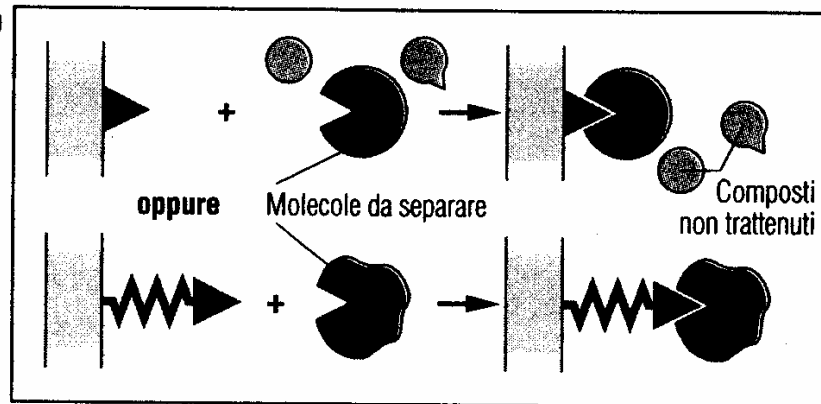
# Fase stazionaria

Le matrici per AFC sono di vario tipo:

- a base di **poliacrilammide** (come BioGel P2);
- a base di **polistirene** (come BioBeads Sx1);
- a base di **agarosio** (AffiGel della BioRad e Sepharose di Pharmacia);
- **gel di silice** (Supelcosil Epoxy 540 della Supelco).

# Fase mobile

In AFC, l'eluente ha un ruolo diverso da quello tipico delle altre tecniche in colonna: sostanzialmente **deve creare delle condizioni che consentano il desorbimento delle specie che sono state bloccate dai leganti della fase stazionaria**



Per questo motivo, spesso oltre a scegliere pH e forza ionica opportuni, si deve introdurre nell'eluente una sostanza che possa indebolire le interazioni fra il legante e la specie bloccata in colonna.