

Figura 12.21 Elettroforesi capillare di cinque peptidi correlati strutturalmente. La lunghezza della colonna era di 100 cm e il voltaggio di separazione di 50 kV. I peptidi sono stati rilevati in base alla loro assorbanza nell'ultravioletto a 200 nm.

| Peptide | |
|---------|---|
| 1 | Lys-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg |
| 2 | Met-Lys-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg |
| 3 | Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg |
| 4 | Ser-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg |
| 5 | Ile-Ser-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg |

(Per gentile concessione di Patrick Camilleri e George Okafo, SmithKline Beecham Pharmaceuticals Ltd.)

cendo nel tampone un tensioattivo come l'SDS. Al di sopra di una certa concentrazione, alcune molecole di tensioattivo si agglomerano formando micelle che, sotto l'influenza del campo elettrico applicato, migreranno verso l'elettrodo appropriato. I soluti interagiranno e verranno ripartiti tra le micelle in movimento. Un soluto che interagisce fortemente raggiungerà il rivelatore dopo uno che interagisce in modo più debole. Questo metodo è noto come elettroforesi capillare micellare elettrocinetica (MECC, *Micellular Electrokinetic Capillary Electrophoresis*). Poiché anche i soluti ionici migreranno sotto l'azione del campo elettrico, la separazione ottenuta con la MECC è dovuta a una combinazione dell'elettroforesi e della cromatografia.

In origine gli sviluppi dell'elettroforesi capillare si erano concentrati sulla separazione dei peptidi e delle proteine; in anni recenti questa tecnica è stata applicata con successo alla separazione di una gamma di altre molecole biologiche. Di seguito vengono forniti alcuni esempi.

In passato, l'analisi dei peptidi veniva eseguita di routine utilizzando l'HPLC a fase inversa, raggiungendo la separazione in base alle differenze di idrofobicità dei vari peptidi. Anche la separazione dei peptidi mediante elettroforesi capillare è ormai diventata un'analisi di routine ed è particolarmente utile, per esempio, come strumento di controllo della qualità

(purezza) di peptidi e proteine prodotti con l'HPLC preparativa. La figura 12.21 illustra l'impressionante grado di separazione che si riesce a ottenere per peptidi con strutture veramente simili.

Per una grande varietà di applicazioni è necessario usare degli oligodesossiribonucleotidi sintetici con un'elevata purezza: tra questi è incluso l'uso di sonde di ibridazione nella diagnostica e negli esperimenti di clonaggio dei geni, l'uso di primer per il sequenziamento del DNA e nella reazione polimerasica a catena (PCR, *Polymerase Chain Reaction*), l'uso nella mutagenesi sito diretta e l'uso come terapeutico di sequenze antisense. Per esempio, l'analisi di un oligonucleotide antisense 18-mer contenente frammenti contaminanti (da 8-mer a 17-mer) si può ottenere in soli 5 minuti.

Con l'elettroforesi capillare si possono identificare mutazioni puntiformi nel DNA, come quelli che si riscontrano in molte patologie umane.

L'elettroforesi capillare può essere utilizzata per quantificare il DNA. Per esempio, l'analisi CE dei prodotti PCR da HIV-1 ha permesso l'identificazione di 200 000-500 000 particelle virali per centimetro cubo di siero.

I composti chirali possono essere risolti usando l'elettroforesi capillare. Molte ricerche sono state eseguite in soluzione libera usando ciclodestrine come selettivi chirali.

Numerose piccole molecole, farmaci e metaboliti possono essere misurati in soluzioni fisiologiche come l'urina e il siero. Tra questi sono inclusi aminoacidi (oltre 50 sono stati trovati nell'urina), nucleotidi, nucleosidi, basi, anioni come cloruro e solfato (NO_2^- e NO_3^- possono essere separati nel plasma umano) e cationi come Ca^{2+} e Fe^{3+} .

12.6 Parole chiave

anfolti
anticorpo primario
anticorpo secondario
blotting delle proteine
capillary blotting
catalisi radicalica
chemiluminescenza intensificata
colorazione ad argento (*silver stain*)
densitometria a scansione
electroblotting
elettroeluzione
elettroendoosmosi

elettroforesi a flusso continuo
elettroforesi bidimensionale su gel di poliaccrilammide
elettroforesi capillare
elettroforesi in condizioni native
elettroforesi su gel di poliaccrilammide con sodio dodecilsolfato (SDS-PAGE)
fotopolimerizzazione
gel di impaccamento
gel in gradiente
isoelettrofocalizzazione

isotacoforesi
mobilità elettroforetica
proteoma
Pulsed-field gel electrophoresis
silver stain
sistemi di documentazione su gel
stacking gel
submarine gel
submerged gel
tag di sequenza
Western blot
zimogramma

12.7 Problemi

DOMANDA 1

La tabella seguente mostra la distanza percorsa in un gel di poliaccrilammide contenente SDS da una serie di proteine di riferimento di massa molecolare relativa nota (M_r). Una proteina X purificata di recente, fatta correre sullo stesso gel, mostra una singola banda che percorre una distanza pari a 45 mm. Costruire un grafico di calibrazione del $\log M_r$ in funzione della distanza percorsa per ciascuna delle proteine di riferimento, quindi determinare la M_r della proteina X.

| Proteina | M_r | Distanza percorsa (mm) |
|--------------------------------------|---------|------------------------|
| Transferrina | 78 000 | 6.0 |
| Albumina da siero bovino | 66 000 | 12.5 |
| Ovoalbumina (albumina dell'uovo) | 45 000 | 32.0 |
| Gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi | 36 000 | 38.0 |
| Anidrasi carbonica | 29 000 | 50.0 |
| Tripsinogeno | 24 000 | 54.0 |
| Inibitore della tripsina della soia | 20 100 | 61.0 |
| β -Lactoglobulina | 18 400* | 69.0 |
| Mioglobina | 17 800 | 69.0 |
| Lisozima | 14 300 | 79.0 |
| Citocromo c | 12 400 | 86.5 |

* Nota: la β -lactoglobulina ha una massa molecolare 36 800, ma è un dimero di due unità identiche di massa molecolare 18 400. In condizioni riducenti presenti nel tampone del campione, i ponti disolfuro che collegano le subunità vengono ridotti e le catene monomeriche vengono separate sul gel.

RISPOSTA

Dal grafico si dovrebbe riuscire a determinare una massa molecolare relativa per la proteina X di circa 31 000. Si noti che questo metodo ha un'accuratezza di $\pm 10\%$, per cui la risposta è $31\,000 \pm 3\,100$.

12.8 Letture consigliate

ALTRIA K.D. *Capillary Electrophoresis Guide Book*. Humana Press, Totowa, NJ 1996.

Discussione dettagliata della teoria e delle procedure pratiche per l'analisi delle proteine, degli acidi nucleici e dei metaboliti.

ANDREWS A.T. *Electrophoresis: Theory, Techniques and Biochemical and Clinical Applications*. Oxford University Press, Oxford 1986.

Testo veramente completo sulla teoria e sui dettagli pratici.

DUNN M.J. *Gel Electrophoresis: Proteins*. Bios Scientific, Oxford 1993.

Un buona introduzione all'elettroforesi su gel.

HAWCROFT D.M. *Electrophoresis: The Basics*. IRL Press, Oxford 1996.

Un testo eccellente sulla teoria alla base delle tecniche elettroforetiche.

WALKER J.M. *The Protein Protocols Handbook*. Humana Press, Totowa, NJ 1996.

Un testo che dettagliatamente riporta teoria e protocolli di laboratorio per numerose tecniche elettroforetiche e di procedure di blotting.

Tecniche cromatografiche

13.1 Introduzione

13.1.1 Coefficienti di distribuzione

Il botanico russo Mikhail Tswett è considerato il primo ad aver sviluppato una tecnica di separazione che adesso riconosciamo come una forma di cromatografia. Nel 1903 egli ottenne con successo la separazione di una miscela di pigmenti delle piante utilizzando una colonna di carbonato di calcio e, durante questo processo, fu il primo ad accorgersi che la clorofilla non è un singolo composto chimico. Le moderne tecniche cromatografiche si presentano in forme multiple, la maggioranza delle quali può essere automatizzata e adattata per trattare quantità molto grandi o molto piccole di sostanze da separare e purificare.

La base di tutte le forme di cromatografia è il coefficiente di partizione o distribuzione (K_d), che descrive il modo in cui un composto si distribuisce tra due fasi immiscibili. Per due fasi immiscibili A e B, il valore del coefficiente è una costante a una data temperatura ed è dato dall'espressione:

$$\frac{\text{concentrazione nella fase A}}{\text{concentrazione nella fase B}} = K_d \quad (13.1)$$

Il coefficiente effettivo di distribuzione viene definito come la quantità totale, distinta dalla concentrazione, di sostanza presente in una fase divisa per la quantità totale presente nell'altra: è, in pratica, il coefficiente di distribuzione moltiplicato per il rapporto dei volumi delle due fasi presenti. Se il coefficiente di distribuzione di un composto tra due fasi A e B è 1 e se questo composto è distribuito tra 10 cm³ di A e 1 cm³ di B, la concentrazione nelle due fasi sarà la stessa, ma la quantità totale del composto nella fase A sarà 10 volte superiore a quella nella fase B.

In generale, tutti i sistemi cromatografici sono costituiti da una fase stazionaria, che può essere un solido, un gel, un liquido o una miscela solido/liquida e che è immobilizzata, e una fase mobile, che può essere liquida o gassosa e che fluisce sopra o attraverso la fase stazionaria. La scelta della fase stazionaria e di quella mobile viene eseguita in modo tale che i composti che devono essere separati abbiano diversi coefficienti di distribuzione. Questo può essere ottenuto con:

- 1) un equilibrio di adsorbimento tra una fase stazionaria solida e una fase mobile liquida (cromatografia di adsorbimento, cromatografia ad interazione idrofobica);

- 2) un equilibrio di partizione tra una fase stazionaria liquida e una fase mobile liquida o gassosa (cromatografia di partizione, cromatografia in fase inversa, cromatografia per accoppiamento ionico, cromatografia chirale, cromatografia di partizione gas-liquida, cromatografia controcorrente);
- 3) un equilibrio di scambio ionico tra uno scambiatore ionico stazionario e una fase elettrolitica mobile (cromatografia a scambio ionico, cromatofocalizzazione);
- 4) un equilibrio tra una fase liquida intrappolata all'interno dei pori di una struttura stazionaria porosa e una fase liquida mobile (cromatografia a esclusione molecolare o cromatografia per permeazione su gel);
- 5) un equilibrio tra un ligando stazionario immobilizzato e una fase liquida mobile (cromatografia per affinità, cromatografia di immunoaffinità, cromatografia di affinità per lectine, cromatografia di affinità per chelazione di metalli, cromatografia per legame a coloranti, cromatografia covalente).

In pratica è abbastanza comune che due o più di questi equilibri siano coinvolti simultaneamente in una particolare separazione cromatografica.

13.1.2 Tipi di cromatografia

Le separazioni cromatografiche possono essere ottenute con due tecniche di base.

1. *Cromatografia su colonna*, in cui la fase stazionaria, attaccata a una matrice adatta (un supporto inerte e insolubile), è impaccata in una colonna di vetro o di metallo e la fase mobile passa attraverso la colonna per gravità o usando un sistema di pompaggio oppure applicando un gas sotto pressione. Questo è il metodo cromatografico usato più comunemente.
2. *Cromatografia su strato sottile o planare*, in cui la fase stazionaria, attaccata a una matrice adatta, ricopre di uno strato sottile una superficie di vetro, plastica o metallo. La fase mobile liquida passa attraverso lo strato sottile, in posizione orizzontale o verticale, per capillarità. Questo metodo cromatografico ha, rispetto al precedente, il vantaggio pratico di consentire lo studio simultaneo di numerosi campioni. La cromatografia planare include quella su carta in cui la fase liquida stazionaria è supportata dalle fibre di cellulosa di un foglio di carta. Come per la cromatografia su strato sottile, la fase mobile attraversa la fase stazionaria immobilizzata per capillarità. Questa forma di cromatografia è una delle più vecchie e oggi ha veramente poche applicazioni biologiche.

Le due tecniche cromatografiche possono essere suddivise in base alla modalità di sviluppo. Con ciò ci si riferisce al modo in cui il campione e la fase mobile sono applicati alla fase stazionaria.

Nella modalità di sviluppo zonale o per eluizione, il campione viene disciolto in un solvente adatto e applicato alla fase stazionaria come una banda stretta e discreta. La fase mobile, a cui ci si riferisce comunemente come eluente e che consiste normalmente di un solvente organico o di una miscela di solventi possibilmente contenenti un sistema tampone acquoso, viene fatta scorrere continuamente sulla fase stazionaria, il che determina la progressiva separazione del campione nei suoi componenti (analiti). Gli analiti con la solubilità più alta nella fase mobile si muoveranno più velocemente attraverso la fase stazionaria. Per facilitare la separazione, la composizione della fase mobile può essere cambiata gradualmente, per esempio

rispetto al pH o alla polarità. Una separazione zonale che ha successo permette l'ottenimento di campioni puri di tutti gli analiti ed è la forma più comune di cromatografia. Quando un particolare analita è stato rimosso dalla colonna dalla fase mobile si dice che è stato eluito.

Nella modalità di sviluppo per rimozione o affinità, il campione è ancora applicato alla fase stazionaria come una banda definita, ma la separazione degli analiti è raggiunta non in base alle caratteristiche fisiche della fase mobile, bensì in base al fatto che essa contiene un soluto specifico avente un'affinità per la fase stazionaria più alta di quella degli analiti. Perciò, quando viene aggiunta la fase mobile, tale agente sostituisce gli analiti nella fase stazionaria in modo competitivo e questo ha come risultato il loro movimento lungo la fase stazionaria e l'eventuale eluizione dalla colonna in ordine secondo la loro affinità con la fase stazionaria: quelli con la più bassa affinità si muoveranno più velocemente.

Nella modalità di sviluppo frontale il campione viene aggiunto in continuazione alla fase stazionaria: così facendo, si forzano gli analiti lungo la fase stazionaria in ordine secondo la loro affinità per essa. L'analita con la più bassa affinità si accumula sul fronte della banda del campione che si muove e, mentre un campione puro di esso può essere isolato, non si possono altrettanto ottenere campioni puri degli altri analiti. In pratica, la tecnica è effettivamente ristretta all'analisi di singole tracce di impurità in un campione altrimenti puro.

13.1.3 Prestazioni della cromatografia su colonna

Il principio di una separazione cromatografica su colonna può essere descritto considerando una colonna impaccata con una fase stazionaria solida granulata di altezza pari a 5 cm, circondata da una fase liquida mobile in ragione di 1 cm³ per cm di colonna, come mostrato nella figura 13.1. Se 32 µg di un composto sono aggiunti alla colonna in 1 cm³ di fase mobile, allora, quando questo volume occupa la posizione A, 1 cm³ di fase mobile uscirà dalla base della colonna. Se il composto aggiunto ha un coefficiente effettivo di distribuzione di 1, si distribuirà ugualmente tra la fase solida e liquida (stadio 1). Se viene introdotto nella colonna un altro cm³ di fase mobile, la fase mobile nella sezione A passerà in B, portandosi dietro 16 µg di composto e lasciando in A gli altri 16 µg (stadio 2). Sia in A sia in B, avverrà una ridistribuzione del composto in modo che ci siano 8 µg nella fase mobile e 8 µg nella fase solida. L'ulteriore aggiunta di 1 cm³ di fase mobile alla colonna sposta in B la fase mobile in A e in C quella in B, dando la distribuzione del composto mostrata nello stadio 3. L'ulteriore aggiunta di 1 cm³ di fase mobile porta alla distribuzione corrispondente allo stadio 4 e un altro cm³ a quella mostrata nello stadio 5.

È evidente che, dopo un numero relativamente piccolo di equilibramenti, il composto si distribuisce simmetricamente all'interno di una banda. Allo stesso modo dovrebbe essere evidente che, se una miscela di due componenti, uno con coefficiente di distribuzione pari a 1 e l'altro a 100, viene aggiunta alla colonna, essa si separerà rapidamente in due bande distinte. In una colonna cromatografica reale avviene un grande numero di equilibramenti man mano che la fase mobile scende lungo la colonna come risultato dell'aggiunta di ulteriore fase mobile in cima alla colonna.

Un tipico sistema cromatografico su colonna, che utilizza una fase mobile liquida, presenta i seguenti elementi: una colonna, un serbatoio per la fase mobile e un sistema di trasporto di questa alla colonna, un rivelatore per identificare i composti separati (analiti) man mano che emergono nell'eluato che lascia la colonna, un registratore e un raccogliatore di frazioni (Fig. 13.2). Il rivelatore e il registratore danno un tracciato continuo della presenza degli ana-

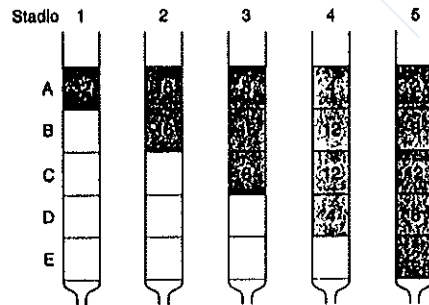


Figura 13.1 Principio della separazione cromatografica su colonna.

liti nell'effluente in base a qualche parametro fisico, per esempio l'assorbimento nell'ultravioletto. Ogni analita separato viene rappresentato come un picco sulla carta del registratore e il raccogliatore di frazioni permette di raccogliere ogni singolo analita separatamente per studiarlo ulteriormente, se necessario. La cromatografia liquida su colonna può essere suddivisa in base alla pressione generata nella colonna durante il processo di separazione: nella cromatografia liquida a bassa pressione (LPLC, *Low Pressure Liquid Chromatography*) si generano pressioni inferiori a 5 bar (1 bar = 14.5 lbf in.⁻² = 0.1 MPa), poiché c'è una piccola resistenza al flusso del solvente, dovuta alla natura fisica della fase stazionaria; nella cromatografia liquida a media pressione (MPLC, *Medium Pressure Liquid Chromatography*) si generano pressioni tra i 6 e i 50 bar e in quella ad alta pressione (HPLC, *High Pressure Liquid Chromatography*) pressioni che superano i 50 bar. In pratica le differenze tra l'MPLC e l'HPLC sono spesso insignificanti e la loro strumentazione e le loro procedure sono pressoché identiche. Entrambe forniscono risoluzioni eccellenti, perciò l'espressione cromatografia liquida ad alta risoluzione viene adottata per entrambe, in quanto descrive meglio le caratteristiche cromatografiche delle due tecniche ed elimina l'idea sbagliata che sia principalmente l'alta pressione responsabile della cromatografia ad alta risoluzione.

13.2 Teoria e pratica della cromatografia

13.2.1 Introduzione

Il successo della separazione cromatografica degli analiti in una miscela dipende dalla scelta della forma di cromatografia più appropriata, seguita dall'ottimizzazione delle condizioni sperimentali associate alla separazione. L'ottimizzazione richiede una profonda conoscenza sia dei processi che avvengono durante la separazione e lo sviluppo sia del calcolo di un grande numero di parametri sperimentali che caratterizzano il comportamento di ciascun analita nella miscela.

In qualsiasi separazione cromatografica avvengono allo stesso tempo due processi che influiscono sul comportamento di ciascun analita e quindi sul successo della separazione. Il primo coinvolge i meccanismi di base che definiscono il processo cromatografico, come l'adsor-

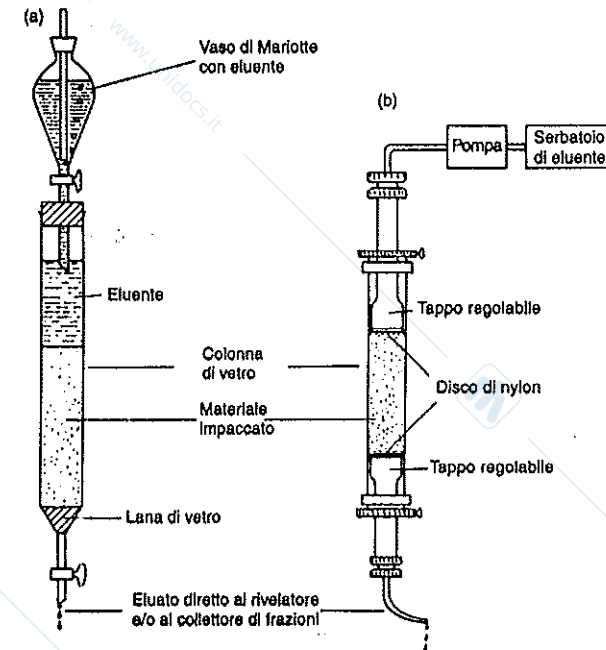


Figura 13.2 Equipaggiamento per cromatografia su colonna: (a) versione semplice; (b) versione sofisticata.

bimento, la partizione, lo scambio ionico, l'accoppiamento ionico e l'esclusione molecolare. Questi processi coinvolgono i processi cinetici e termodinamici unici che caratterizzano l'interazione di ciascun analita con le fasi mobili e stazionarie. Il secondo processo generale, che include per esempio la diffusione, tende a opporsi alla separazione e dà luogo a un comportamento non ideale di ciascun analita: questi processi si manifestano come un allargamento o una coda della banda di ciascun analita. La sfida è di ridurre questi processi secondari.

I parametri associati alle prestazioni di un dato sistema cromatografico sono meglio illustrati in relazione alla cromatografia su colonna, ma sono ugualmente applicabili a quella su carta.

13.2.2 Il cromatogramma: tempo e volume di ritenzione

Un cromatogramma è la rappresentazione illustrata della risposta del rivelatore in funzione del tempo o del volume di eluizione. Consiste in una serie di picchi, che rappresentano l'eluizione dei singoli analiti, come mostrato nella figura 13.3. Il tempo di ritenzione t_R per ciascun analita ha due componenti. La prima è il tempo che occorre alla molecola di analita

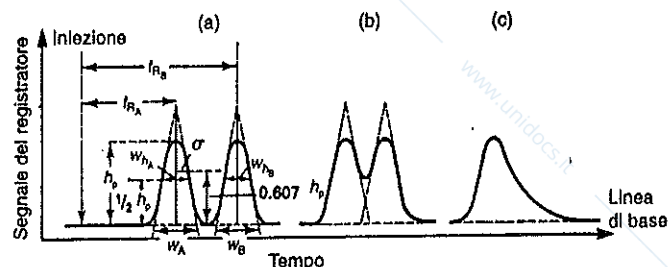


Figura 13.3 (a) Cromatogramma di due composti che mostra una completa risoluzione dei picchi e il calcolo dei tempi di ritenzione; (b) due composti che danno una risoluzione incompleta e la produzione di picchi fusi; (c) un composto che mostra un fenomeno di scodamento eccessivo.

per passare attraverso gli spazi liberi nella matrice della fase stazionaria. Ci si riferisce a questo spazio come volume vuoto della colonna, V_0 , e al tempo che occorre per attraversarlo come tempo morto, t_M . Il valore di t_M sarà lo stesso per tutti gli analiti e può essere misurato utilizzando un soluto che non interagisce con la fase stazionaria, ma semplicemente occupa tutto il tempo di eluizione nella fase mobile viaggiando attraverso il volume vuoto. La seconda componente è il tempo in cui l'analita viene trattenuto dalla fase stazionaria, t'_R . Questo tempo è caratteristico dell'analita. Il suo valore, a cui ci si riferisce come tempo di ritenzione adattato, è dato quindi da:

$$t'_R = t_R - t_M \quad (13.2)$$

È pratica comune mettere in relazione il tempo di ritenzione t_R o t'_R per un analita con uno standard interno o esterno (13.2.5). In questi casi viene spesso calcolato il tempo di ritenzione relativo, che corrisponde semplicemente al tempo di ritenzione per l'analita diviso quello per lo standard.

13.2.3 Fattore di capacità

Uno dei più importanti parametri nella cromatografia è il fattore di capacità, k' , ossia il tempo relativo che occorre all'analita per eluire dalla colonna in relazione a un analita non trattenuto o escluso che non interagisce con la fase stazionaria e, per definizione, ha un k' pari a 0. Per cui

$$k' = \frac{t_R - t_M}{t_M} = \frac{t'_R}{t_M} \quad (13.3)$$

Da questa equazione è evidente che, se l'analita passa un tempo uguale nella fase stazionaria e in quella mobile, il suo t_R uguaglia $2 t_M$ e il suo k' sarà uguale a 1; se invece passa nella fase stazionaria un tempo quattro volte più lungo di quello passato nella fase mobile, il suo k' sarà uguale a 4. Notate che k' non ha unità.

Se un analita ha un k' di 4 ne consegue che la quantità di analita nella fase stazionaria sarà quattro volte superiore a quella della fase mobile in ogni momento. È evidente, quindi, che k'

è relazionato al coefficiente di distribuzione dell'analita (equazione 13.1), che è stato definito come le concentrazioni relative dell'analita tra le due fasi. Poiché la quantità e la concentrazione sono in relazione con il volume, si può scrivere

$$k' = \frac{t'_R}{t_M} = \frac{M_S}{M_M} = K_d \times \frac{V_S}{V_M} \quad (13.4)$$

dove M_S è la massa dell'analita nella fase stazionaria, M_M la massa dell'analita nella fase mobile, V_S il volume della fase stazionaria e V_M il volume della fase mobile.

Ci si riferisce al rapporto V_S/V_M come al rapporto volumetrico di fase, β . Quindi

$$k' = K_d \beta \quad (13.5)$$

Il fattore di capacità per un analita aumenterà quindi sia con il coefficiente di distribuzione tra le due fasi sia con il volume della fase stazionaria. I valori di k' sono normalmente compresi nell'intervallo da 1 a 10. I fattori di capacità sono importanti perché sono indipendenti dalle dimensioni fisiche della colonna e dalla velocità di flusso della fase mobile attraverso essa. Essi possono essere quindi utilizzati per confrontare il comportamento di un analita in diversi sistemi cromatografici. C'è anche un riflesso della selettività del sistema che è una misura della sua capacità intrinseca di discriminare tra due analiti. Tale selettività è espressa dalla selettività o fattore di separazione, α , che può anche essere considerato semplicemente come il rapporto di ritenzione relativo per i due analiti:

$$\alpha = \frac{k'_A}{k'_B} = \frac{K_{dA}}{K_{dB}} = \frac{t'_{RA}}{t'_{RB}} \quad (13.6)$$

Il fattore di selettività è influenzato dalla natura chimica della fase stazionaria e della fase mobile. Alcuni meccanismi cromatografici sono molto selettivi. Buoni esempi sono forniti dalla cromatografia per affinità (13.9) e dalla cromatografia chirale (13.6.5).

13.2.4 Efficienza della colonna e risoluzione

Si ritiene che le colonne cromatografiche consistano in un numero di zone adiacenti in ciascuna delle quali c'è spazio sufficiente per l'analita per equilibrarsi completamente tra le due fasi. Ogni zona è chiamata piatto teorico (ce ne sono N in totale nella colonna) per analogia con le colonne per la distillazione. Ci si riferisce alla lunghezza della colonna contenente un piatto teorico come altezza del piatto, H , che ha normalmente come unità di misura i micrometri. I valori numerici sia di N sia di H per una particolare colonna sono espressi in funzione di un particolare analita. L'altezza del piatto è semplicemente relazionata alla larghezza del picco dell'analita e alla distanza che ha percorso all'interno della colonna, x , specificatamente:

$$H = \frac{\sigma^2}{x} \quad (13.7)$$

dove σ è la deviazione standard della banda gaussiana (Fig. 13.3). Per i picchi gaussiani simmetrici, la larghezza della base è uguale a 4σ e la larghezza del picco al punto di inflessione, w_1 è uguale a 2σ , per cui il valore di H può essere calcolato dal cromatogramma

misurando la larghezza del picco, il numero di piatti teorici in tutta la colonna è quindi dato da

$$N = \frac{L}{H} = \frac{Lx}{\sigma^2} \quad (13.8)$$

dove L è la lunghezza della colonna.

Se si considera la posizione di un picco in uscita dalla colonna cosicché $x = L$, e il fatto che la larghezza del picco alla sua base, w , ottenuta dalle tangenti disegnate nelle due parti più ripide del picco, è uguale a 4σ , si può convertire l'equazione 13.8 in

$$N = \frac{16L^2}{w^2} \quad (13.9)$$

Se sia L sia w sono misurati in unità di tempo piuttosto che di lunghezza, allora l'equazione 13.9 diventa:

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{w} \right)^2 \quad (13.10)$$

Le equazioni 13.9 e 13.10 rappresentano quindi modi alternativi di calcolare l'efficienza di colonna in piatti teorici. Il valore di N , che non ha unità, può raggiungere valori pari a 50 000 e 100 000 per metro per colonne efficienti e il valore corrispondente di H può essere molto piccolo pari a pochi micrometri. Più piccola è l'altezza del piatto (più grande il valore di N), più stretto è il picco dell'analita (Fig. 13.4). Tuttavia, il processo di diffusione si oppone a questo restringimento del picco dell'analita. La legge di Fick sulla diffusione (equazione 8.10) afferma che un composto diffonderà da una regione ad alta concentrazione a una a bassa concentrazione a una velocità determinata dal gradiente di concentrazione e dal coefficiente di diffusione dell'analita. Perciò l'analita all'interno di una banda stretta tenderà a diffondere verso l'esterno, dando come risultato un allargamento della banda. Ci sono altre ragioni per l'allargamento della banda. In primo luogo, c'è semplicemente il fatto che occorre un tempo finito per applicare la miscela dell'analita alla colonna, per cui la parte del campione applicata per prima starà già muovendosi lungo la colonna nel tempo in cui la parte finale viene applicata. La parte del campione applicata per prima verrà eluita al fronte del picco. In secondo luogo, nelle colonne impaccate, ci sono vari percorsi attraverso le particelle sia per la fase mobile sia per gli analiti e questi percorsi varieranno in lunghezza e quindi in tempo di eluizione. Più piccole sono le dimensioni delle particelle meno grave è questo problema; nelle colonne tubolari aperte il fenomeno è totalmente assente, e questa è una delle ragioni per cui esse danno un minor tempo di eluizione e migliori risoluzioni delle colonne impaccate.

In alcune separazioni cromatografiche, non si ottengono picchi dalla forma ideale gaussiana, ma piuttosto vengono prodotti picchi asimmetrici. Nei casi in cui i picchi sono costituiti da una salita graduale e da una discesa ripida, si verifica un fenomeno noto come *fronting*, la cui causa più comune è il sovraccarico nella colonna. Riducendo la quantità di miscela applicata alla colonna spesso si risolve il problema. Nei casi in cui la salita nel picco è normale ma la coda si prolunga, si verifica un fenomeno noto come *tailing* o scodamento (Fig. 13.3), la probabile spiegazione del quale è la ritenzione dell'analita da parte di alcuni "siti attivi" nella fase stazionaria, comunemente sulla matrice di supporto inerte. Questi siti assorbono forte-

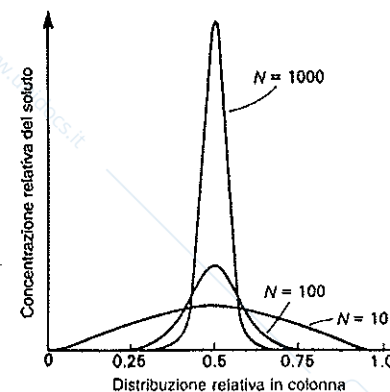


Figura 13.4 Relazione tra il numero di piatti teorici (N) e la forma del picco dell'analita.

mente le molecole dell'analita e le rilasciano solo lentamente. Il problema può essere superato rimuovendo chimicamente i siti, più comunemente trattando la matrice con un reagente silanizzante come l'esametildisilazina. Questo processo è noto come *capping*.

Il successo di una separazione cromatografica è giudicato dalla capacità del sistema di separare il picco di un analita da un altro. La risoluzione è definita come il rapporto della differenza nel tempo di ritenzione tra i due picchi al valore medio delle loro larghezze di base (w_{av}):

$$R_S = \frac{2(t_{RA} - t_{RB})}{w_A + w_B} = \frac{\Delta t_R}{w_{av}} \quad (13.11)$$

Quando $R_S = 1.0$, la separazione dei due picchi è completa al 97.7% (per cui la sovrapposizione è del 2.3%). Quando $R_S = 1.5$ la sovrapposizione è ridotta allo 0.2%. I picchi non risolti sono detti fusi (Fig. 13.3). A condizione che la sovrapposizione non sia eccessiva, l'analisi dei singoli picchi può essere fatta assumendo che le loro caratteristiche non siano influenzate dalla risoluzione incompleta.

La risoluzione è condizionata dall'efficienza della colonna, dal fattore di selettività e dai fattori di capacità secondo l'equazione:

$$R_S = \frac{\sqrt{N}}{4} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k'_2}{1 + k'_{av}} \right) \quad (13.12)$$

dove k'_2 è il fattore di capacità per il picco trattenuto più a lungo e k'_{av} è il fattore di capacità medio per i due analiti.

L'equazione 13.12 è una delle più importanti in cromatografia in quanto permette di utilizzare un approccio razionale per migliorare la risoluzione tra i composti. Per esempio, si può vedere che la risoluzione aumenta con \sqrt{N} . Poiché N è collegato alla lunghezza della colonna, raddoppiare quest'ultima aumenterà la risoluzione di $\sqrt{2}$, cioè di un fattore pari a 1.4. Poiché sia i fattori di capacità sia quelli di selettività sono collegati ai tempi e ai volumi di ri-

tenzione, alterare la natura delle due fasi o i loro volumi relativi avrà un impatto sulla risoluzione. I fattori di capacità sono anche dipendenti dai coefficienti di distribuzione, che a loro volta sono condizionati dalla temperatura; alterare la temperatura di colonna può migliorare la risoluzione. La capacità di una particolare separazione cromatografica è una misura della quantità di materiale che può essere risolta nelle sue componenti senza causare sovrapposizione dei picchi o *fronting*. La cromatografia a scambio ionico (13.7) e la cromatofocalizzazione (13.7.3) hanno un'alta capacità, e questo è il motivo per cui esse vengono spesso utilizzate negli stadi iniziali di un processo di purificazione.

13.2.5 Quantificazione degli analiti: standard interni ed esterni

Quando l'eluato di colonna è stato analizzato dando origine a un tracciato su carta, allora generalmente si può mostrare che l'area di ogni picco è proporzionale alla quantità di un dato analita eluito dalla colonna. L'area del picco può essere determinata misurando l'altezza del picco (h_p) e la sua larghezza a metà dell'altezza (w_h). Si prende il prodotto di queste dimensioni come uguale all'area del picco. In alternativa, il picco può essere ritagliato dal tracciato su carta e pesato assumendo che l'area e il peso siano relazionati linearmente. Tali procedure portano via veramente molto tempo quando sono coinvolte analisi complesse e/o molto numerose. I calcoli sono meglio eseguiti utilizzando integratori dedicati o microcomputer, che possono essere programmati per calcolare il tempo di ritenzione e l'area del picco e per mettere in relazione questi con quelli degli standard (composti puri di riferimento), permettendo di calcolare i rapporti relativi di ritenzione e i rapporti relativi delle aree dei picchi. Queste possono essere utilizzate per identificare un particolare analita e per quantificarlo utilizzando dati di calibrazione dagli standard ottenuti e memorizzati in precedenza. Il sistema di dati può anche essere impiegato per correggere problemi inerenti al sistema cromatografico. Tali problemi possono derivare sia dalle caratteristiche del rivelatore sia dall'efficienza del processo di separazione. I problemi attribuibili al rivelatore sono lo spostamento della linea di base, dove il segnale del rivelatore cambia gradualmente con il tempo, e il rumore della linea di base, che è una serie di rapide fluttuazioni minori nel segnale del rivelatore, comunemente il risultato dell'uso da parte dell'operatore di una sensibilità del rivelatore troppo alta oppure di un disturbo elettronico.

Quando la nuova area del picco è stata determinata, si può stabilire la quantità di analita presente usando una curva di calibrazione ottenuta cromatografando, in condizioni identiche, quantità note della forma pura dell'analita. Per aiutare questo saggio cercando di compensare le variazioni nelle condizioni cromatografiche e per qualsiasi procedura di estrazione preliminare, si fa uso di uno standard interno. Esso è un composto che ha proprietà fisiche il più possibile simili agli analiti in esame e con cromatogrammi vicini ai loro, ma distinti. Idealmente dovrebbe avere la stessa risposta al rivelatore degli analiti. Una quantità nota dello standard viene introdotta nel campione in esame prima possibile nell'estrazione e viene quindi portata con esso attraverso qualsiasi procedura preliminare. Qualsiasi perdita dello standard durante l'analisi sarà identica alla perdita degli analiti in esame. L'area del picco associato alla quantità fissa di standard interno è usata per calcolare il rapporto relativo dell'area del picco per ogni picco sia nei dati di calibrazione sia nel campione in analisi. Una curva di calibrazione consiste quindi in un grafico di rapporto relativo del picco dell'area in

funzione della quantità nota di analita, che permette di calcolare la quantità di analita nel campione in esame. Un procedura alternativa consiste nell'usare uno standard esterno. In questo metodo lo standard è aggiunto al campione in esame immediatamente prima che il campione venga cromatografato e vengono prodotte indipendentemente rette di calibrazione separate per soluzioni standard e campione. Non viene quindi portato attraverso la procedura di estrazione preliminare e non può essere utilizzato per compensare per le variazioni nell'efficienza della procedura di estrazione. Tale metodo è valido solo nei casi in cui il recupero dell'analita dal campione in esame è virtualmente quantitativo e in quelli in cui non ci sono fluttuazioni a breve termine nella risposta del rivelatore.

13.2.6 Preparazione del campione

Anche se le tecniche cromatografiche sono progettate per separare miscele di composti, questo non significa che non si debba prestare attenzione alla purificazione preliminare (*clean up*) del campione in esame. Al contrario, è chiaro che, per determinazioni quantitative che usano le tecniche HPLC in particolare, questa azione preliminare è essenziale specialmente se il (i) composto(i) in esame è in una miscela complessa come plasma, urina, omogenato cellulare o mezzo di coltura per microbiologia. L'estrazione e la purificazione dei componenti da un omogenato cellulare è spesso un processo complesso multistadio. I principi associati per la purificazione delle proteine sono discussi nel capitolo 6, 6.3. Per alcune forme di analisi, per esempio quella dei farmaci nei fluidi biologici, la preparazione del campione è relativamente facile. La tecnica di purificazione più semplice e più comunemente usata è l'estrazione con solventi. Questa è basata sul fatto che i composti organici possono essere solitamente estratti da miscele acquose con un solvente a basso punto di ebollizione immiscibile con l'acqua, come il dietilene o il diclorometano. La tecnica è un'altra applicazione del principio dei coefficienti di partizione. I composti organici che sono deboli elettroliti, come gli acidi e le basi, possono esistere in forme ionizzate o non ionizzate in funzione del loro pK_a e del pH predominante. Per l'estrazione in un solvente organico vengono richieste generalmente le specie non ionizzate e quindi il pH del campione in esame deve essere regolato al valore appropriato. I solventi organici, come il dietilene e il diclorometano, estraggono anche quantità significative d'acqua e, in genere, questa deve essere rimossa, per esempio mediante l'aggiunta di un sale anidro come solfato di sodio o solfato di magnesio, prima che l'estratto venga evaporato fino a secchezza (spesso in atmosfera di azoto o sotto vuoto), dissolto in un appropriato solvente, come metanolo o acetonitrile, e sottoposto a separazione cromatografica. Questa procedura di estrazione con solvente è carente in selettività ed è spesso insoddisfacente per le analisi in HPLC dei composti in quantità di $ng\ cm^{-3}$ o anche meno. A volte può essere migliorata con la tecnica dell'accoppiamento ionico (13.6.4).

L'alternativa all'estrazione con solvente è l'estrazione in fase solida. Il vantaggio di quest'ultima rispetto alla semplice estrazione con solvente è che mostra una selettività maggiore, principalmente perché è una forma di cromatografia. La soluzione in esame viene fatta passare su una piccola colonna (di lunghezza pari a pochi millimetri) impaccata con particelle relativamente grandi di silice legata, simile a quella utilizzata per l'HPLC (13.4.3). Queste assorbono selettivamente l'analita in esame e idealmente permettono ai composti interferenti di passare. Un'attenzione preliminare va data al tipo particolare di silice scelta e il campione in esame deve

essere trattato con agenti come l'acido tricloroacetico, l'acido perclorico o i solventi organici, come l'acetonitrile per deprotenizzarlo in modo da minimizzare la possibilità del legame di proteine all'analita. Deve anche essere regolato il pH della soluzione in esame per massimizzare la ritenzione dell'analita. Una volta che si è fatta passare la soluzione in esame attraverso la colonna, per semplice spinta gravitazionale o applicando un leggero vuoto nel recipiente di raccolta, la colonna viene lavata con acqua e l'analita assorbito viene recuperato per eluizione con un solvente organico, come il metanolo o l'acetonitrile. È usato il volume minimo possibile di solvente di eluizione perché l'analita viene poi recuperato evaporando la soluzione fino a secchezza (in atmosfera di azoto o sotto vuoto) e il residuo viene dissolto nel minimo volume di un appropriato solvente prima dell'analisi cromatografica. Di questa tecnica di estrazione in fase solida sono disponibili diverse forme commerciali che facilitano il trattamento simultaneo di un grande numero di campioni da analizzare.

Una procedura più sofisticata per la preparazione del campione, particolarmente adatta all'analisi di analiti in concentrazioni molto basse nelle miscele complesse per mezzo dell'HPLC, è la tecnica nota come column switching. In questa tecnica, la soluzione in esame è applicata preliminarmente a una piccola colonna simile a quella usata nell'estrazione in fase solida. Una volta che l'analita in esame è stato assorbito e le impurità sono state eliminate dalla colonna, l'analita viene eluito con un solvente organico adatto e l'eluato trasferito direttamente a una colonna HPLC analitica. Tecnicamente questo risultato non è facile da ottenere e, oltretutto, richiede diverse pompe e valvole di switch che lo rendono assai costoso. Uno dei principali problemi presentati da questa tecnica è che tutti i composti interferenti, se non vengono eluiti dalla colonna preliminare prima che l'analita assorbito venga passato alla colonna analitica, si accumulano eventualmente nella colonna analitica riducendone il potere di risoluzione. Ciò nonostante, con questa tecnica, è stato possibile ottenere molte difficili risoluzioni.

In anni recenti, è stato analizzato un nuovo approccio alla preparazione del campione. Nota con il nome di estrazione con fluidi supercritici (SFE, *Supercritical Fluid Extraction*), questa tecnica sfrutta il fatto che i gas, come l'anidride carbonica, esistono allo stato liquido in certe condizioni critiche. Nel caso dell'anidride carbonica, queste condizioni sono 31.1 °C e 7.38 MPa (10.7 lbf in.⁻²); la risultante anidride carbonica liquida può essere utilizzata come solvente di estrazione, comportandosi come un solvente a bassa polarità, se confrontato con l'esano. Alterando le condizioni fisiche dell'estratto, l'anidride carbonica può essere riportata allo stato gassoso, semplificando così il recupero degli analiti estratti.

La tecnica della derivatizzazione pre- o postcolonna dell'analita può facilitare la separazione cromatografica e la rivelazione. La derivatizzazione è progettata per migliorare la separazione e la rivelazione dell'analita, usando reagenti del tipo mostrato nella tabella 13.1.

13.3 Cromatografia a bassa pressione su colonna

13.3.1 Colonne

La colonna di vetro usata dovrebbe avere un supporto della fase stazionaria il più vicino possibile alla base della colonna per ridurre al minimo lo spazio morto al di sotto del supporto della colonna, nel quale potrebbe avvenire mescolamento postcolonna di analiti separati. Le colonne commerciali possiedono sia un filtro di vetro poroso fuso sopra la base della colonna sia un dispositivo adatto a supportare una rete di nylon intercambiabile, che a sua volta so-

Tabella 13.1 Esempi di reagenti derivatizzanti

| Analita | Reagente |
|---------------------------------------|---|
| A. Precolonna | |
| <i>Rivelazione nell'ultravioletto</i> | |
| Alcol, ammine, fenoli | 3,5-Dinitrobenzoilcloruro |
| Aminoacidi, peptidi | Fenilisotiocianato, cloruro di dansile |
| Carboidrati | Benzoilcloruro |
| Acidi carbossilici | 1- <i>p</i> -Nitrobenzile- <i>N,N'</i> -diisopropilisourea |
| Acidi grassi, fosfolipidi | Fenacil bromuro, naftacil bromuro |
| <i>Rivelazione elettrochimica</i> | |
| Aldeidi, chetoni | 2,4-Dinitrofenilidrazina |
| Ammine, aminoacidi | <i>o</i> -Ftalaldeide, fluorodinitrobenzene |
| Acidi carbossilici | <i>p</i> -Ammnofenolo |
| <i>Rivelazione per fluorescenza</i> | |
| Aminoacidi, ammine, peptidi | Dansilcloruro, dabsilcloruro, fluorescamina, <i>o</i> -ftalaldeide |
| Acidi carbossilici | 4-Bromometile-7-metossicumarina |
| Composti carbonilici | Dansilidrazina |
| B. Postcolonna | |
| <i>Rivelazione nell'ultravioletto</i> | |
| Aminoacidi | Fenilisotiocianato |
| Carboidrati | Orcinolo e acido solforico |
| Penicilline | Imidazolo e cloruro di mercurio |
| <i>Rivelazione per fluorescenza</i> | |
| Aminoacidi | <i>o</i> -Ftalaldeide, fluorescamina, 6-aminoquinolil- <i>n</i> -idrossisuccinimidil carbammato |

stiene la fase stazionaria. Un'alternativa meno costosa a questi supporti commerciali consiste nell'usare un piccolo strato di lana di vetro insieme con una quantità minima di sabbia di quarzo o di particelle di vetro. Un tubo capillare, di solito, guida l'eluato dalla colonna al rivelatore e/o a un collettore di frazioni (Fig. 13.2). Per alcune separazioni cromatografiche è necessario che la temperatura della colonna sia mantenuta costante durante la separazione. Ciò si può ottenere facilmente ricoprendo la colonna, di modo che il liquido di un bagno controllato termostaticamente (posto alla temperatura di lavorazione richiesta, che potrebbe essere al di sotto della temperatura della stanza) possa essere pompato attorno alla parte esterna della colonna. Metodi più sofisticati prevedono il posizionamento della colonna in un blocco riscaldato o in un forno a controllo termostatico.

13.3.2 Materiali per le matrici

La matrice è il materiale usato per sostenere la fase stazionaria. La selezione di una matrice per una particolare fase stazionaria è di importanza fondamentale per il successo nell'uso cro-

matografico della fase. Parlando in termini generali, una matrice necessita di un'alta stabilità meccanica per facilitare buone velocità di flusso e per ridurre al minimo la caduta di pressione lungo la colonna; di una buona stabilità chimica; di gruppi funzionali per facilitare il fissaggio della fase stazionaria; di elevata capacità, ossia della densità dei gruppi funzionali per minimizzare il volume di letto. È poi necessario che la matrice sia disponibile in una serie di dimensioni di particelle. Inoltre, alcuni tipi di cromatografia richiedono una matrice a struttura porosa, nel qual caso i pori devono essere della misura e della forma corrette. Infine, la superficie di una matrice deve essere chimicamente inattiva per ridurre al minimo l'adsorbimento non selettivo degli analiti. Nella pratica, i sei tipi di matrice più comunemente usati sono quelli descritti di seguito.

Agarosio. Un polisaccaride fatto di D-galattosio e di 3,6-anidro-1-galattosio unità (Fig. 12.4).

Le catene di polisaccaride non ramificate sono legate tra loro con agenti quali 2,3-dibromopropanolo per produrre gelatine stabili nell'intervallo di pH da 3 a 14. Essi possiedono buone proprietà di flusso ed elevata idrofilicità ma non dovrebbero mai essere lasciati seccare, pena cambiamenti irreversibili. Esempi commerciali includono Sepharose e Bio-Gel A.

Cellulosa. Un polisaccaride di unità di glucosio collegate mediante legami β -1-4. Per l'uso come matrice essa presenta legami crociati con l'epicloroidrina e la quantità di legami crociati determina la misura del poro. È disponibile in particelle, forme microgranulari e fibrose, presenta buona stabilità al pH e proprietà di flusso ed è altamente idrofila.

Destrano. Un polisaccaride che consiste di unità di glucosio collegate mediante legami α -1-6. Per l'uso come matrice esso presenta legami crociati con epicloroidrina, ma è meno stabile all'idrolisi acida di quanto non lo siano le matrici di cellulosa. È stabile fino a pH 12 ed è idrofilico. Esempi commerciali includono il Sephadex.

Poliacrilammide. Un polimero di acrilammide con legami crociati con N,N'-metilene-bis-acrilammide (Fig. 12.5). È stabile a valori di pH da 2 a 11. Esempi commerciali includono il Bio-Gel P.

Polistirene. Un polimero di stirene con legami crociati con divinilbenzene. Le matrici di polistirene presentano una buona stabilità a tutti i valori di pH e vengono usate più comunemente per la cromatografia a esclusione e per quella a scambio ionico. Esse presentano idrofilicità relativamente bassa.

Silice. Un materiale polimerico prodotto dall'acido ortosilicico. I numerosi gruppi di silanolo (Si-OH) lo rendono idrofilico. Quando viene derivatizzato, i gruppi di silanolo in eccesso possono essere rimossi mediante un trattamento con triclorometilsilano. La stabilità delle matrici di silice è limitata ai valori di pH da 3 a 8. Molto simile alle matrici di silice è il vetro a porosità controllata. Esso è chimicamente inerte, ma, allo stesso modo delle matrici di silice, tende a dissolversi oltre il valore di pH 8.

13.3.3 Fasi stazionarie

La natura chimica della fase stazionaria dipende dalla particolare forma di cromatografia che deve essere eseguita. Dettagli approfonditi vengono forniti nei successivi paragrafi di questo capitolo. La maggior parte delle fasi stazionarie è disponibile legata alle matrici in una serie di dimensioni e forme. Entrambe le proprietà sono importanti perché esse influiscono sulla

velocità di flusso e le caratteristiche di risoluzione. Più grande è la particella, più veloce sarà la velocità di flusso, ma, all'inverso, più piccola è la particella, più ampio sarà il rapporto area della superficie/volume e potenzialmente più grande sarà il potere di risoluzione. Nella pratica è necessario trovare un equilibrio. Le migliori caratteristiche di impaccamento sono date da particelle sferiche e la maggior parte delle fasi stazionarie ora possiede forma sferica o approssimativamente sferica. La dimensione delle particelle è comunemente espressa in termini di mesh, che è una misura dei pori presentati dal setaccio per pollice; quindi, più ampia è la dimensione del mesh, più piccola è la particella. Un mesh da 100-120 è il più comune, mentre un mesh da 200-400 viene usato per lavori a più elevata risoluzione.

13.3.4 Impaccamento della colonna

Questo è uno dei fattori più critici nel successo di una separazione tramite qualsiasi forma di cromatografia su colonna. L'impaccamento di una colonna viene eseguito versando delicatamente una sospensione della fase stazionaria nella fase mobile all'interno di una colonna che presenta l'uscita chiusa, mentre la sospensione nella parte superiore della colonna viene agitata e/o la colonna è delicatamente ostruita per assicurare che nessuna bolla d'aria rimanga intrappolata e che la fase stazionaria si depositi in maniera omogenea.

Nel caso di un impaccamento grossolano della colonna, c'è il rischio di creare un flusso non omogeneo (*channeling*) e una ridotta risoluzione. La sospensione viene aggiunta fino a ottenere l'altezza richiesta e a questo punto comincia il flusso della fase mobile attraverso la colonna impaccata aprendo l'uscita, che viene continuata fino a completo impaccamento. Questo processo, di solito, richiede una considerevole pratica per ottenere risultati riproducibili. Per impedire che la superficie del materiale impaccato venga disturbata dall'aggiunta della fase mobile alla colonna oppure durante l'applicazione del campione alla colonna, è normale posizionare un'adatta protezione, come per esempio un disco di carta da filtro o una garza di nylon o di rayon, sulla superficie della colonna. Alcune colonne in commercio possiedono un adattatore con il duplice ruolo di proteggere la superficie della colonna e di fornire un ingresso (spesso un tubo capillare) per portare la fase mobile alla superficie della colonna. Quando una colonna è stata preparata, è assolutamente indispensabile che nessuna delle sue parti si secchi, per cui uno strato di fase mobile dovrebbe sempre essere mantenuto al di sopra della superficie della colonna.

È difficile generalizzare riguardo alla proporzione ideale altezza/diametro della colonna e al volume di letto totale. Entrambi influenzano la quantità di materiale che può venir separato sulla colonna e nella pratica dovranno essere determinati attraverso vari tentativi. L'esperienza, spesso, funge da guida; quindi, per esempio, nella cromatografia a esclusione, è solitamente appropriata una proporzione altezza/diametro da 10:1 a 20:1.

13.3.5 Applicazione del campione

Sono disponibili diversi metodi per applicare il campione sulla colonna preparata. Un modo semplice consiste nel rimuovere la maggior parte della fase mobile dall'alto mediante aspirazione e nel far semplicemente defluire il rimanente all'interno del letto della colonna. Il campione viene poi applicato con attenzione attraverso una pipetta e viene lasciato scor-

rere anch'esso all'interno della colonna. Un volume piccolo di fase mobile viene poi applicato in maniera simile per far fluire le ultime tracce di campione nel letto. Una quantità più elevata di fase mobile viene attentamente aggiunta alla colonna a una altezza che varia dai 2 ai 5 cm. La colonna viene quindi connessa a un serbatoio adatto, che contiene la fase mobile, in modo che l'altezza della fase mobile sulla colonna possa essere mantenuta a 2-5 cm. Un procedimento alternativo, che evita la necessità di eliminare la fase mobile stratificata sulla colonna, consiste nell'aumentare la densità del campione aggiungendo del saccarosio a una concentrazione di circa 1%. Quando questa soluzione viene stratificata sul liquido posto sopra al letto della colonna, essa sprofonderà automaticamente verso la superficie della colonna stessa e quindi velocemente passerà in essa. Questo metodo di applicazione del campione è soddisfacente, a condizione che la presenza del saccarosio non interferisca in alcun modo con la separazione e la conseguente analisi del campione. Un terzo modo implica l'uso di tubi capillari e/o di una siringa o di una pompa peristaltica per far passare il campione direttamente sulla superficie della colonna. Quest'ultimo metodo è il più soddisfacente dei tre.

In ogni caso, bisogna aver cura di evitare di sovraccaricare di campione la colonna, altrimenti avverrà una separazione irregolare. È inoltre vantaggioso applicare il campione in quantità più piccola possibile, perché questo assicura che si formi una banda stretta di materiale quando comincia la separazione.

13.3.6 Sviluppo della colonna ed eluizione del campione

I componenti del campione applicato vengono separati dal continuo passaggio della fase mobile attraverso la colonna. Questo processo è noto come sviluppo della colonna (13.1.2). Durante il processo di eluizione è essenziale che il flusso della fase mobile venga mantenuto a una velocità stabile e il modo più semplice per raggiungere questo scopo consiste nell'uso della gravità. La velocità di flusso può essere regolata adattando la pressione di esercizio, che corrisponde alla differenza tra il livello del liquido nel serbatoio situato sopra la colonna e il livello all'uscita della stessa. Un comune serbatoio aperto non è soddisfacente perché, durante l'esperimento, la caduta di livello nel serbatoio quando la fase mobile scorre nella colonna provoca la caduta della pressione di esercizio. Tale inconveniente può essere superato usando un vaso di Mariotte, che manterrà costante la pressione operativa (Fig. 13.2). Un metodo alternativo e più efficace per mantenere stabili velocità di flusso consiste nell'usare una pompa peristaltica. Le pompe più comunemente impiegate sono di tipo rotante (Fig. 13.5). Queste incanalano la fase mobile liquida attraverso tubi di silicone, polivinilcloruro o fluoruro comprimendo i tubi appena il disco girevole viene fatto ruotare a una velocità predeterminata secondo la velocità di flusso richiesta. Pompe e tubi di diametro noto devono essere precalibrati per determinare la velocità di flusso. Bisogna fare attenzione quando si usano le pompe affinché la pressione di esercizio non comprima eccessivamente la colonna causando un cambiamento della sua struttura.

Uno sviluppo della colonna che avviene utilizzando un singolo liquido come fase mobile è conosciuto con il nome di eluizione isocratica. Comunque, in molti casi per incrementare il potere di risoluzione della fase mobile, è necessario cambiare continuamente il suo pH, la concentrazione ionica o la polarità. Questo procedimento è conosciuto come eluizione

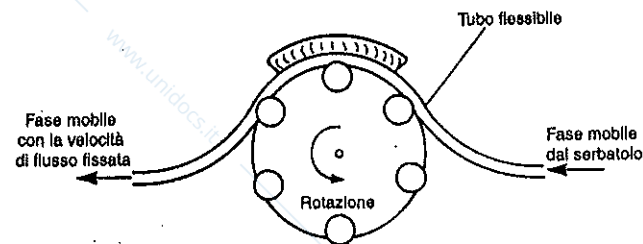


Figura 13.5 Pompa peristaltica semplice, comunemente usata nella cromatografia liquida a bassa pressione.

in gradiente. Per produrre un gradiente adatto, bisogna miscelare due eluenti nella corretta proporzione prima che vengano immessi nella colonna. Ciò si può ottenere mediante l'uso di formatori di gradienti disponibili in commercio o, più semplicemente, nel seguente modo: i due eluenti vengono posizionati in camere separate, una ricevente, collegata alla colonna, e una donatrice, collegata alla camera ricevente tramite un sifone (Fig. 13.6). Appena l'eluente entra nella colonna dalla camera ricevente, l'eluente nella camera donatrice prende il suo posto (lo rimpiazza) e viene mescolato da un agitatore. I valori relativi di pH, forza ionica o polarità dell'eluente nella camera donatrice in rapporto a quello nella camera ricevente determinerà la direzione nella quale il gradiente verrà formato. Inoltre, i relativi diametri e le relative forme delle due camere determineranno se il gradiente varierà nel tempo in maniera lineare, convessa o concava (Fig. 13.6b). In sistemi più sofisticati, vengono usate due pompe per consegnare i due eluenti a velocità predeterminate all'interno di un'area di mescolamento, prima dell'applicazione alla colonna. Gradienti convessi danno una risoluzione migliore all'inizio, mentre gradienti concavi danno una risoluzione migliore nella parte finale.

13.3.7 Rivelatori e raccoglitori di frazioni

Appena gli analiti separati nei loro costituenti escono con l'eluato dalla colonna, è necessario rivelare la loro presenza. Nel caso di analiti colorati, ciò si può ottenere semplicemente con l'osservazione visiva, ma per composti incolore sono necessarie delle alternative. La rivelazione può basarsi sull'assorbimento della luce ultravioletta, sulla spettroscopia per fluorescenza, su cambiamenti nell'indice di rifrazione dell'eluato, sulla presenza di un atomo radioattivo, sulla facilità di ossidazione o riduzione degli analiti, che vengono misurati da un rivelatore elettrochimico (cap. 15, 15.7).

I rivelatori a raggi ultravioletti sono probabilmente i più comuni nell'analisi biochimica. Gli strumenti migliori permettono di rivelare la presenza di proteine e di quantificarle a lunghezze d'onda tra i 190 e i 220 nm e tra i 260 e i 280 nm (cap. 6, 6.3.2). I rivelatori per fluorescenza di solito danno una più grande sensibilità se possono essere usati, ma tendono a essere più sensibili alle impurità presenti nella fase mobile. Tutti i rivelatori spettrofotometrici utilizzano celle a flusso continuo con un piccolo volume interno (ti-

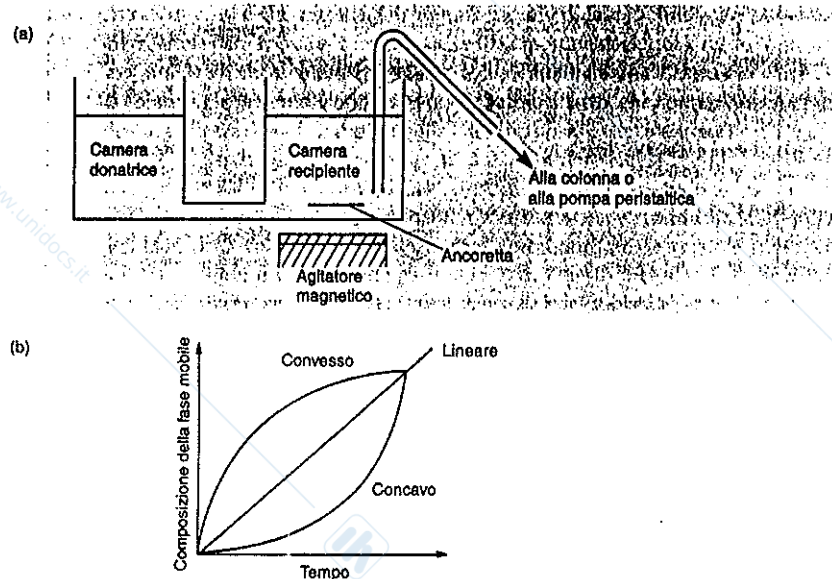


Figura 13.6 (a) Apparato semplice per la formazione di gradienti di eluzione e (b) forme di gradiente più comunemente usate.

picamente 8 mm^3), che permettono il rilevamento continuo dell'eluato della colonna (cap. 9, 9.4.2).

Per studi in cui si deve raccogliere e studiare l'analita nell'eluato, quest'ultimo (l'eluato) deve essere diviso in frazioni. Sono disponibili due tipi di approccio per raggiungere tale obiettivo: il primo prevede che l'eluato possa essere continuamente analizzato e che la frazione contenente un particolare analita venga raccolta; il secondo prevede che l'eluato possa essere diviso in piccole frazioni (da 1 a 10 cm^3), che vengono successivamente analizzate e delle quali quelle contenenti un particolare analita vengono riunite insieme.

Vari tipi di raccoglitori automatici di frazioni sono disponibili in commercio. Essi sono progettati per raccogliere una certa quantità di eluato in ogni tubo, prima che un nuovo tubo sia posizionato automaticamente. La quantità di eluato in ogni frazione può essere determinata in uno dei seguenti modi: attraverso un sistema di sifoni o un sistema simile per far arrivare un volume predeterminato in ogni tubo, oppure mediante un sistema elettronico con cui lasciar entrare in ogni tubo un numero predeterminato di gocce di eluato. Quest'ultimo metodo presenta il piccolo svantaggio che, se la composizione dell'eluato cambia (per esempio durante l'eluzione in gradiente), può cambiare di conseguenza anche la sua tensione superficiale e quindi la dimensione delle goccioline, e così cambia anche il volume reale raccolto. Un'ulteriore possibilità è che l'eluato venga raccolto in ogni tubo per

un intervallo di tempo fissato. In questo caso se la velocità di flusso attraverso la colonna varia, si modificherà anche il volume di ogni frazione, cosa insolita, per cui, nella pratica, i raccoglitori a tempo fisso sono i più comuni.

13.4 Cromatografia liquida ad alta risoluzione (HPLC)

13.4.1 Principi teorici

Come risulta dalle equazioni da 13.1 a 13.12, il potere di risoluzione di una colonna cromatografica aumenta con la lunghezza della colonna e il numero dei piatti teorici per unità di lunghezza, sebbene ci siano limiti di lunghezza di una colonna dovuti al problema dell'allargamento dei picchi. Essendo il numero dei piatti teorici in relazione con l'area di superficie della fase stazionaria, ne consegue che più piccola è la dimensione della fase stazionaria, migliore è la risoluzione. Sfortunatamente, più piccola è la dimensione della particella, più grande è la resistenza al flusso della fase mobile. Questo crea una contropressione nella colonna che può danneggiare la struttura della matrice della fase stazionaria, di fatto riducendo il flusso dell'eluente e rendendo irregolare la risoluzione. Nel recente passato c'è stato un notevole sviluppo nella tecnologia della cromatografia su colonna, che ha dato come risultato la disponibilità di nuove fasi stazionarie con particelle di dimensioni più piccole, che possono sopportare queste pressioni. Tale sviluppo, avvenuto nell'adsorbimento, nella partizione, nello scambio ionico, nell'esclusione e nella cromatografia per affinità, ha dato come risultato una risoluzione più veloce e migliore, e questo spiega perché l'HPLC sia la forma di cromatografia più conosciuta, potente e versatile. Molti sistemi HPLC esistenti in commercio sono controllati da un microprocessore per permettere separazioni cromatografiche dedicate e continue.

13.4.2 Colonne

Le colonne (Fig. 13.7) usate per l'HPLC sono solitamente fatte di acciaio inossidabile e sono costruite per sopportare pressioni fino a $5.5 \times 10^7 \text{ Pa}$ ($\sim 8000 \text{ lbf in.}^{-2}$). Sono generalmente usate colonne dritte della lunghezza da 15 a 50 cm e del diametro da 1 a 4 mm, sebbene siano disponibili colonne microbore più piccole o colonne aperte tubulari. Le colonne microbore hanno un diametro interno da 1 a 2 mm e sono lunghe generalmente 25 cm. Possono sostenere velocità di flusso da 0.05 a $0.20 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ rispetto ai $2 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ delle colonne HPLC convenzionali. Si trovano in commercio anche colonne preparative, con diametri interni che vanno fino ai 25 mm; esse possono sostenere velocità di flusso fino a $100 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$. Le migliori colonne sono calibrate ad alta precisione, con una rifinitura interna a specchio che consente un efficace impaccamento della colonna. Setti porosi di acciaio inossidabile o Teflon vengono utilizzati alle estremità delle colonne per trattenere il materiale di impaccamento. Questi setti devono essere omogenei per assicurare un flusso uniforme di liquido attraverso la colonna. È vantaggioso, in alcune separazioni che implicano cromatografia liquida a partizione e cromatografia a scambio di ioni, mantenere la temperatura della colonna leggermente al di sopra di quella ambiente (fino a 60°C) durante l'analisi.

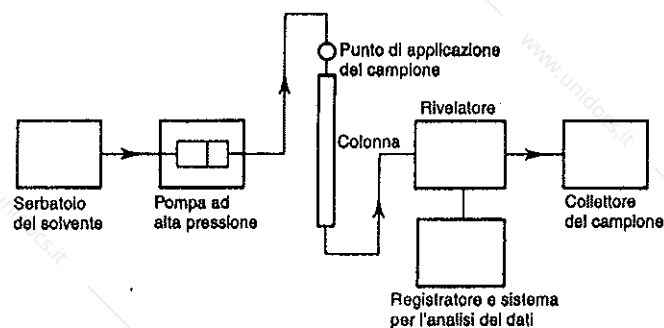


Figura 13.7 Diagramma dei componenti di un sistema HPLC isocratico.

13.4.3 Matrici e fasi stazionarie

Sono disponibili tre tipi di materiale di supporto, che si basano su una struttura rigida solida (in contrapposizione a quella gelatinosa).

Supporti microporosi, in cui i micropori si ramificano all'interno delle particelle, che misurano generalmente dai 5 ai 10 μm di diametro.

Supporti pellicolari (porosi in superficie), in cui particelle porose sono poste a rivestimento di un nucleo (core) solido inerte, come una pallina di vetro di circa 40 μm di diametro.

Fasi legate, in cui la fase stazionaria viene legata chimicamente su un supporto inerte come il silice.

Per la cromatografia di adsorbimento, adsorbenti come il silice e l'allumina sono disponibili in forme microporose o pellicolari con varie dimensioni delle particelle. I sistemi pellicolari di solito possiedono un'alta efficienza ma una bassa capacità di campione; per questa ragione vengono preferiti supporti microporosi, quando disponibili.

Nei sistemi cromatografici a partizione, la fase stazionaria può essere posta a rivestimento di un supporto inerte microporoso o pellicolare. Uno svantaggio dei supporti ricoperti con fasi liquide è che la fase mobile durante lo sviluppo può gradualmente lavare via la fase liquida. Per superare questo problema, sono state sviluppate fasi legate in cui il materiale di supporto è costituito dal silice.

Nella cromatografia liquida in fase normale, la fase stazionaria è un composto polare, come un nitrile alchilico o un'alchilammina, e la fase mobile è un solvente non-polare, come l'esano. Per la cromatografia liquida a fase inversa, la fase stazionaria è un composto non-polare, come l'octasilano (OS) o l'octadecilsilano (ODS), e la fase mobile è un solvente polare come acqua/acetonitrile oppure acqua/metanolo.

Sono disponibili molti tipi diversi di scambiatori ionici adatti per l'HPLC, tra i quali sono largamente usate le resine microporose di polistirene con un certo grado di legami crociati. Sono inoltre disponibili resine pellicolari costituite da scambiatori a fase legata legati covalentemente a una rete crociata di silicene. Queste resine vengono classificate come gel forti e resistono senza problemi alle pressioni generate durante l'analisi.

Le fasi stazionarie per le separazioni mediante cromatografia ad esclusione sono costituite solitamente di silice porosa, di vetro, di palline di polistirene o di polivinilacetato, disponibili in una serie di dimensioni dei pori. Vengono generalmente usate quando il solvente eluente è un sistema organico.

Gel semirigidi come Sephadex o Bio-Gel P e gel non rigidi come Sepharose e Bio-Gel A vengono utilizzati poco in HPLC perché possono resistere solo a basse pressioni. I supporti per le separazioni per affinità sono simili a quelli per le separazioni per esclusione. Il braccio spaziatore e il ligando sono attaccati a questi supporti attraverso mezzi chimici simili a quelli usati nella cromatografia convenzionale per affinità a bassa pressione (13.9). La tabella 13.2 presenta la lista di alcuni esempi di fasi stazionarie per HPLC comunemente usate.

13.4.4 Impaccamento della colonna

Le colonne HPLC possono essere acquistate già impaccate con il materiale richiesto, della struttura e dimensioni volute. Molti ricercatori, comunque, preferiscono impaccare da soli le loro colonne perché è più economico. Sono disponibili diversi metodi per impaccare le colonne e il metodo usato dipenderà dalla natura del materiale da impaccamento e dalle dimensioni delle particelle. La priorità maggiore durante l'impaccamento di una colonna è quella di ottenere un letto di materiale uniforme senza crepe o scanalature. I solidi rigidi e i gel forti dovrebbero essere impaccati nella forma più densa possibile, senza però creare frat-

Tabella 13.2 Alcuni esempi di fasi stazionarie HPLC

| Tipo di separazione cromatografica | Nome commerciale | Natura della fase stazionaria | Tipo di supporto |
|------------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|------------------|
| Adsorbimento | Partisil C ₈ | Octilsilano | Poroso |
| | Corasil | Silice | Pellicolare |
| | Pellumina | Allumina | Pellicolare |
| | Partisil | Silice | Microporoso |
| | MicroPak A 1 | Allumina | Microporoso |
| Partizione | Bondapak-C ₁₈ /Corasil | Octadecilsilano | Pellicolare |
| | μ Bondapak-C ₁₈ | Octadecilsilano | Poroso |
| | ULTRApak TSK ODS | Octadecilsilano | Poroso |
| | μ Bondapak-NH ₂ | Alchilammina | Poroso |
| | ULTRApak TSK NH ₂ | Alchilammina | Poroso |
| Scambio ionico | Partisil-SAX | Base forte | Poroso |
| | MicroPak-NH ₂ | Base debole | Poroso |
| | Partisil-SCX | Base forte | Poroso |
| | AS Pellionex-SAX | Base forte | Pellicolare |
| | Zipak-WAX | Base debole | Pellicolare |
| | Perisorb-KAT | Base forte | Pellicolare |
| Esclusione | Bio-Glas | Vetro | Solido rigido |
| | Styragel | Polistirene-divinilbenzene | Gel semirigido |
| | Superose | Agariosio | Gel morbido |
| | Fractogel TSK | Polivinilcloruro | Gel semirigido |

ture nelle particelle durante il processo di impaccamento. La tecnica di impaccamento più largamente usata è quella di risospensione ad alta pressione. Una sospensione del materiale di impaccamento è creata in un solvente dalla densità uguale a quella del materiale di impaccamento. La sospensione viene quindi pompata rapidamente ad alta pressione dentro una colonna con un setto poroso all'uscita. Il letto di materiale impaccato, che ne risulta all'interno della colonna, può essere preparato per l'uso facendo scorrere la fase mobile in via di sviluppo attraverso la colonna. Quando è necessario usare gel forti, bisogna lasciar decantare il materiale nel solvente che si andrà a usare nel procedimento cromatografico prima che vengano impaccati sotto pressione. I gel morbidi non possono essere impaccati sotto pressione; devono essere impaccati partendo da una sospensione così come avviene nell'impaccamento delle colonne per l'PLC (13.3.4).

13.4.5 Fasi mobili e pompe

La scelta della fase mobile da utilizzare dipenderà dal tipo di separazione che si intende raggiungere. Le separazioni isocratiche possono essere effettuate con una pompa singola, utilizzando un solo solvente o due o più solventi precedentemente mescolati insieme in proporzioni prefissate.

L'eluizione in gradiente (13.3.6) usa solitamente pompe differenti per convogliare due solventi nelle proporzioni prefissate da un programmatore di gradiente. Tutti i solventi da usare nei sistemi HPLC devono essere purificati in modo particolare, poiché tracce di impurità possono avere effetto sulla colonna e interferire con il sistema di rilevamento. Questo è soprattutto il caso di un sistema di rilevamento che stia misurando l'assorbanza al di sotto dei 200 nm. Solventi aventi un grado di purezza adatto all'uso in sistemi HPLC sono disponibili in commercio, ma, anche con questi solventi, è generalmente introdotto un microfiltro da 1 a 5 μm nel sistema prima della pompa. Inoltre è indispensabile che tutti i solventi vengano degassati prima dell'uso, altrimenti i gas (bolle d'aria nel solvente) tendono a localizzarsi nelle pompe. La presenza di gas, che tendono a formarsi particolarmente con soluzioni acquose di metanolo ed etanolo, può alterare la risoluzione della colonna e interferire con il monitoraggio continuo dell'eluato. Il degasamento può avvenire in diversi modi: riscaldando il solvente, miscelandolo vigorosamente con un agitatore magnetico, con una pompa da vuoto, con gli ultrasuoni, facendo gorgogliare elio gassoso nel serbatoio del solvente.

I sistemi di pompaggio per convogliare la fase mobile sono uno degli elementi più importanti dei sistemi HPLC. Le caratteristiche principali di un buon sistema di pompe sono queste: che sia capace di una pressione in uscita di almeno $5 \times 10^7 \text{ Pa}$ ($\sim 7200 \text{ lbf in.}^{-2}$) e che non presenti pulsazioni (cioè variazioni cicliche nella pressione), perché questo può influire sulla risposta del rivelatore. Deve esserci una capacità di flusso di almeno $10 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ e fino a $100 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ per separazioni preparative. Sono disponibili diversi sistemi di pompe che operano sul principio della pressione costante o del flusso costante.

Le pompe a portata costante mantengono una velocità di flusso costante attraverso la colonna, indipendentemente dal cambiamento delle condizioni all'interno di essa. Un tipo di pompa a spostamento costante è quella del tipo a siringa azionata tramite motore, che convoglia un volume prefissato di solvente alla colonna mediante un pistone mosso da motore.

La pompa a siringa a volume costante contiene una vite a banda azionata da un motore di avanzamento. Nella fase di consegna dell'eluente, il pistone viene mosso a una velocità costante, spostando l'eluente sulla colonna alla stessa velocità. Due valvole a senso unico controllano il flusso dell'eluente nella camera (Fig. 13.8a). La pompa alternativa è il tipo di pompa a portata costante più comunemente usata. Il pistone è mosso da una biella motorizzata e l'entrata di solvente nella colonna è regolata da valvole di controllo. Nella fase di compressione il solvente viene spinto sulla colonna dalla camera della pompa. Durante la fase di ritorno la valvola di controllo d'uscita si chiude e il solvente viene introdotto tramite la valvola di entrata, nella camera della pompa, pronto a essere pompato nella colonna durante la successiva fase di compressione. Tali pompe producono piccole pulsazioni e solitamente, per minimizzare questo effetto, vengono incorporati nel sistema degli smorzatori di pulsazioni. Tutte le pompe a portata costante possiedono meccanismi di sicurezza interni di sconnessione automatica così che, se la pressione nei sistemi cromatografici varia oltre i limiti prefissati, la pompa si disattiva automaticamente.

13.4.6 Caricamento del campione

L'applicazione corretta del campione su una colonna HPLC è un fattore particolarmente importante per ottenere buone separazioni e generalmente viene usato uno dei due seguenti metodi possibili. Il primo utilizza una microsiringa per iniettare il campione direttamente sulla colonna o su un piccolo strato di materiale inattivo subito al di sopra della colonna impaccata. Questa iniezione può essere fatta mentre il sistema è sotto pressione o può richiedere che la pompa venga spenta e, quando la pressione è calata quasi al livello di quella atmosferica, viene praticata l'iniezione e quindi la pompa viene riattivata. Quest'ultimo approccio viene chiamato iniezione a flusso interrotto. Il secondo metodo di introduzione del campione che conserva la pressione in colonna si ha tramite l'uso di un iniettore a spirale (Fig. 13.9). Esso consiste in una spirale di metallo, di un volume piccolo fisso, che può essere riempito con il campione. Attraverso un sistema appropriato di valvole, l'eluente dalla pompa viene incanalato attraverso la spirale, la cui uscita porta direttamente sulla colonna. Il campione viene quindi caricato in colonna attraverso l'eluente senza interruzione di flusso alla colonna. Un'applicazione ripetuta di campioni grezzi come sieri, urina, plasma o sangue intero, che sono stati preferibilmente deproteinizzati, può infine causare alla colonna la perdita del suo potere di risoluzione. Per evitare questa evenienza, viene frequentemente installata una precolonna tra l'iniettore e la colonna analitica. Questa precolonna è una colonna piccola (da 1 a 2 cm) con lo stesso diametro interno e impaccata con lo stesso materiale della colonna analitica. L'impaccamento nella precolonna trattiene preferenzialmente il materiale contaminante e viene rimpiazzato a intervalli regolari.

13.4.7 Rivelatori

Poiché la quantità di materiale applicato alla colonna è spesso molto piccola, è necessario che la sensibilità del sistema di rivelazione sia sufficientemente elevata e stabile per rispondere alla bassa concentrazione di ogni analita nell'eluato. Più comunemente il rivelatore è un let-

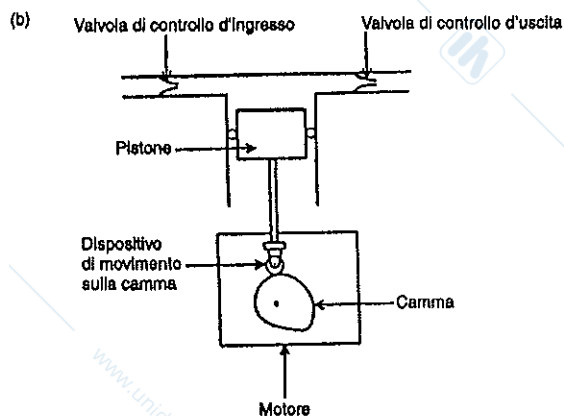
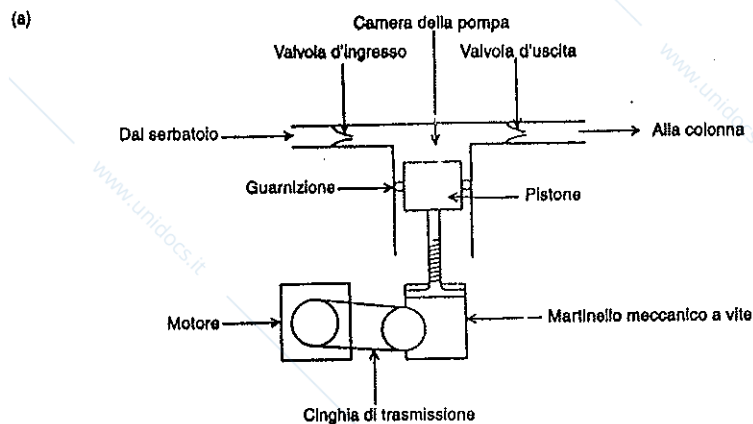


Figura 13.8 Pompe a portata costante usate comunemente: (a) volume costante; (b) alternativa. In entrambi i tipi il movimento verso il basso del pistone chiude la valvola di uscita e apre la valvola di entrata per far entrare eluente nella camera della pompa. Il movimento verso l'alto del pistone chiude la valvola di entrata e apre la valvola di uscita per mandare l'eluente verso la colonna. (Riprodotte per gentile concessione della Academic Press Inc. (London) Limited, da R. Newton in *Food Analysis* curato da R. Macrae, 1982.)

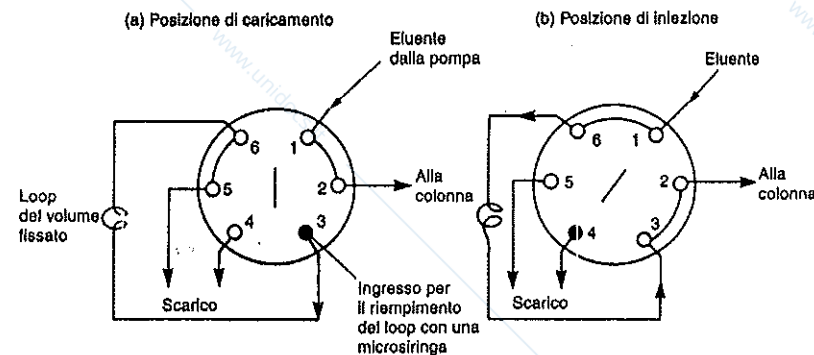


Figura 13.9 L'iniettore a spirale per HPLC: la spirale (o loop) viene caricata (a) dall'entrata 3 con l'eccesso di campione che viene scartato dall'entrata 5. In questa posizione l'eluente dalla pompa passa alla colonna attraverso le posizioni 1 e 2. Nella posizione di iniezione (b), il flusso dell'eluente passa direttamente attraverso la spirale (entrate 1 e 6) e poi alla colonna.

tore a lunghezza d'onda variabile che si basa sulla spettrofotometria visibile e ultravioletta. Questo tipo di rivelatore riesce a misurare le assorbanze fino a 190 nm di lunghezza d'onda e ha sensibilità dell'ordine di 0,001 unità di assorbanza (AUFS). I rivelatori a scansione della lunghezza d'onda hanno il vantaggio di registrare lo spettro completo di assorbimento di ogni analita, aiutando quindi l'identificazione. Tali opportunità sono possibili fermando temporaneamente il flusso dell'effluente o utilizzando tecniche a diodi (*diode array*), che permettono di misurare contemporaneamente l'assorbanza a molte o a tutte le lunghezze d'onda in un tempo di 0,01 s (Fig. 13.10).

I rivelatori per fluorescenza sono estremamente utili per l'HPLC perché sono molto sensibili, ma tale tecnica è limitata dal fatto che relativamente pochi composti emettono fluorescenza. I rivelatori elettrochimici, che sono selettivi per le specie elettroattive (cap. 15, 15.7), sono potenzialmente altamente sensibili. Sono disponibili in due tipologie, quella amperometrica e quella coulometrica, i cui principi sono simili. Una cella a flusso è fornita di due elettrodi: un elettrodo stabile di riferimento (Ag/AgCl o calomelano) e un elettrodo di misura, altamente polarizzabile. Viene applicato un potenziale costante all'elettrodo di misura a un valore tale per cui, quando un analita scorre attraverso la cella di flusso, le molecole alla superficie dell'elettrodo subiscono un'ossidazione o una riduzione, dando come risultato un flusso di corrente tra i due elettrodi. Il potenziale applicato all'elettrodo di riferimento è sufficiente per assicurare che la corrente rivelata generi una risposta massima sul registratore. I composti che possono subire l'ossidazione includono idrocarburi, ammine, amidi, fenoli, di- e triazine, fenotiazine, catecolammine e chinoline. I composti che possono subire riduzione includono olefine, esteri, chetoni, aldeidi, eteri, azo- e nitrocomposti. La fase mobile dovrebbe certamente essere priva di composti che possano rispondere al rivelatore. Il rivelatore elettrochimico ha avuto particolare successo nel saggiare le catecolammine, le vitamine e gli antiossidanti.

Forse il più grande progresso nel sistema di rivelazione mediante l'uso di HPLC si è avuto tramite l'accoppiamento dell'HPLC a uno spettrometro di massa. I problemi tecnici associati all'organizzazione della rimozione della fase mobile prima dell'introduzione del campione nello spettrometro di massa sono stati risolti in molti modi. L'interfacciamento diretto consiste in un flusso di eluato attraverso un capillare in una sonda di inserzione situata nello spettrometro di massa. L'analia entra nella fonte di ionizzazione insieme con un eccesso di molecole della fase mobile e di conseguenza la ionizzazione è debole e predominano spettri CI (cap. 11, 11.3) piuttosto che spettri EI (cap. 11, 11.4). Comunque lo ione $(M + H)^+$ dell'analia è chiaramente visibile e ciò facilita l'identificazione della struttura. La ionizzazione a termospray (TSI) (cap. 11, 11.7.1) solitamente richiede l'uso di una fase mobile acquosa che contiene in genere acetato di ammonio. La terminazione di un capillare riscaldato (400 °C) in cui si trova l'eluato entra in una camera nella quale avviene un bombardamento di elettroni e dove viene effettuato il vuoto da un sistema di pompaggio (*vacuum pumping*). La temperatura elevata crea un getto supersonico di goccioline che sono ionizzate e gradatamente ridotte di dimensioni grazie al sistema di pompaggio. Alla fine gli ioni dell'analia sono espulsi dalla gocciolina nell'analizzatore di massa.

Gli spettri CI sono registrati ancora come ioni $(M + H)^+$ o $(M + NH_4)^+$. Nella ionizzazione a elettrospray (ESI) (cap. 11, 11.7.2) il capillare contenente l'eluato è mantenuto a un voltaggio elevato e l'eluato viene mischiato con azoto. Il voltaggio crea una carica sulla superficie liquida che causa la sua dispersione in uno spray molto fine. Il solvente nelle goccioline fini evapora e viene trascinato via dall'azoto. Gli ioni dell'analia vengono trascinati via come un flusso supersonico in una camera da vuoto e alla fine nell'analizzatore di massa. Più recentemente, l'HPLC è stato interfacciato con la spettroscopia NMR per fornire informazioni strutturali riguardo agli analiti complementari a quelle ottenute mediante HPLC-MS.

La sensibilità dei rivelatori per assorbimento all'ultravioletto, per fluorescenza ed elettrochimici può essere spesso accresciuta in maniera significativa attraverso il processo di derivatizzazione, per cui l'analia viene convertito a un suo derivativo chimico mediante un trattamento pre- o postcolonna. Vengono forniti esempi nella tabella 13.1.

13.4.8 Applicazioni

Le grandi applicabilità, velocità e sensibilità dell'HPLC hanno prodotto come risultato che essa è diventata una delle più note forme di cromatografia e praticamente tutti i tipi di molecole biologiche sono stati dosati o purificati usando questa tecnica. L'HPLC ha avuto un forte impatto sulla separazione degli oligopeptidi e delle proteine. Strumenti dedicati alla separazione delle proteine hanno dato luogo alla tecnica della cromatografia liquida veloce delle proteine (FPLC, *Fast Protein Liquid Chromatography*). Non ci sono principi unici associati all'FPLC; esso è semplicemente basato sulla cromatografia a fase inversa, per affinità, per esclusione, a interazione idrofobica e a scambio ionico, e sulla cromatofocalizzazione. Le colonne di acciaio inossidabile microbore rivestite di vetro permettono di usare una quantità molto piccola di campione, con la separazione che avviene in solo 10 min. La tecnica permette che miscele complesse, come digeriti triptici di proteine e surnatanti di colture di microrganismi, vengano applicate direttamente alla colonna, mentre le miscele

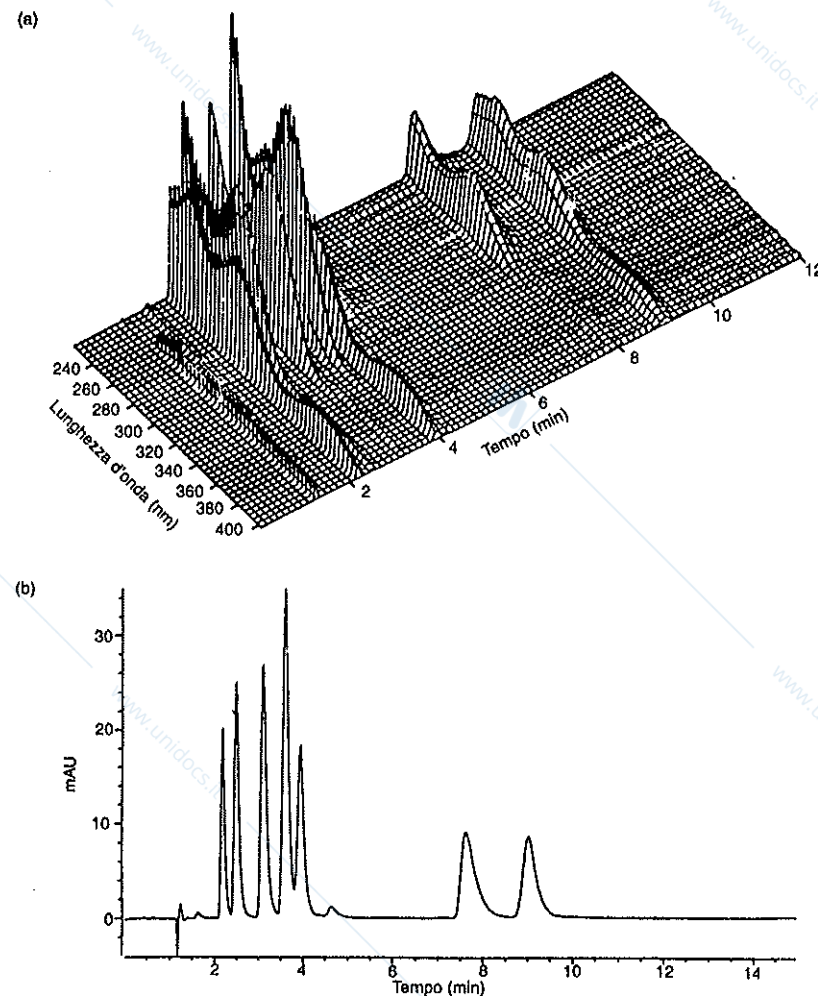


Figura 13.10 Separazione in HPLC della lacipidina, bloccante diidropiridinico del canale del calcio, e dei suoi metaboliti. Colonna: ODS Hypersil. Eluente: metanolo/acetonitrile/acqua (66%, 5%, 29% in volume), acidificato a pH 3.5 con 1% di acido formico. Velocità di flusso: $1 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$. Temperatura della colonna: 40 °C. (a) Registrazione mediante un rivelatore a diodi; (b) registrazione mediante un rivelatore a ultravioletti. (Riprodotta per gentile concessione della Glaxo Wellcome, Stevenage.)

di proteine da estratti cellulari necessitano ancora di qualche forma di frazionamento preliminare (cap. 6, 6.3.3) prima di essere analizzate.

13.4.9 Elettrocromatografia capillare (CEC)

Quest'ultimo sviluppo nella cromatografia è effettivamente un ibrido di HPLC ed elettroforesi capillare (cap. 12, 12.5). Come suggerisce il nome, essa viene eseguita in colonne capillari nelle quali la fase stazionaria viene legata a un supporto inattivo e impaccata o viene ricoperta direttamente sopra le pareti del capillare. Come avviene nella elettroforesi capillare, viene applicato lungo la superficie del capillare un potenziale, che genera un flusso di solvente attraverso la elettroosmosi (cap. 12, 12.1). Questo flusso elettroosmotico (EOF) guida il solvente e gli analiti nel campione applicato attraverso la colonna capillare. Mentre gli analiti si spostano lungo il capillare, essi sono soggetti alle forze opposte dell'EOF e della distribuzione tra le fasi mobile e stazionaria. Essi verranno quindi separati in parte sulla base delle loro differenze nei coefficienti di distribuzione, K_D , tra le due fasi, esattamente come in tutte le altre forme di cromatografia. Inoltre, comunque, essi saranno influenzati dalle differenze riguardanti la loro mobilità elettroforetica come nella elettroforesi capillare. La conseguenza è che il fattore di capacità, K' , caratteristico della cromatografia, non è valido nella CEC.

Fino a oggi, la CEC è stata utilizzata nella tipologia della fase inversa. Le fasi stazionarie utilizzate sono simili a quelle dell'HPLC basate sulle matrici di silice. La fase mobile è solitamente un sistema organico-acquoso che contiene un elettrolita. L'EOF viene generato all'interfaccia solido-liquido. La superficie di silice è caricata negativamente a causa della deprotonizzazione dei gruppi di silanolo e quindi le molecole della fase mobile assumono una netta carica positiva, formando perciò un doppio strato elettrico. Le molecole caricate positivamente vicino alla superficie del silice inducono cambiamenti simili nelle molecole vicine. Sotto influenza del campo applicato, queste molecole migrano verso l'elettrodo negativo, trascinando il grosso della fase mobile con loro. La velocità di EOF è determinata da un numero di fattori che include il campo applicato, la viscosità e la costante dielettrica della fase mobile. Essa è significativamente più lenta nelle colonne a capillare impaccate che nel tipo a tubo aperto. La strumentazione per CEC è simile a quella per CE a eccezione del fatto che entrambe le terminazioni della colonna sono pressurizzate per assicurare che non ci sia alcun calo di pressione. Vengono comunemente usate colonne che misurano 50 cm \times 100 μ m e, poiché il flusso è prodotto dall'elettroosmosi piuttosto che dalla pressione applicata, possono essere usate particelle di dimensioni più piccole (da 1.5 a 5 μ m) rispetto all'HPLC, con il risultato che l'efficienza della colonna è molto più elevata in CEC e il tempo di risoluzione più breve che in HPLC. CEC è potenzialmente una forma di cromatografia molto interessante grazie alla sua miniaturizzazione e al suo basso costo. Attualmente la CEC è ancora in fase di sviluppo, ma entro un decennio potrebbe sfidare l'HPLC, come la tecnica di separazione preferita.

13.5 Cromatografia di adsorbimento

13.5.1 Principi teorici

Questa è la classica forma di cromatografia basata sul principio che alcuni materiali solidi, noti nell'insieme come adsorbenti, hanno la capacità di trattenere le molecole alla loro super-

ficie. Questo processo di adsorbimento, che coinvolge forze d'interazione deboli, non-ioniche, del tipo delle forze di van der Waals e del tipo dei legami idrogeno, avviene in siti di adsorbimento specifici. Tali siti hanno la capacità di discriminare tra molecole e nel processo di adsorbimento cromatografico sono occupati da molecole dell'eluente o degli analiti presenti nella miscela in proporzioni che dipendono dalle forze relative della loro interazione. Mentre l'eluente viene costantemente passato attraverso la colonna, le differenze in queste forze di legame portano infine alla separazione degli analiti. La forza di legame di un particolare analita dipende dai gruppi funzionali presenti nella sua struttura. I gruppi idrossilici e quelli aromatici tendono ad aumentare l'interazione con la superficie di adsorbimento, mentre i gruppi alifatici di differente dimensione, di solito, differiscono solo leggermente nella loro interazione. In generale, la cromatografia ad adsorbimento è influenzata più dalla presenza di gruppi specifici che dalla semplice dimensione molecolare, perché solo un gruppo specifico può che l'intera molecola può interagire con il sito di adsorbimento.

Un adsorbente caratteristico è il silice, che presenta gruppi di silanolo (Si - OH) sulla sua superficie. Questi gruppi, che sono leggermente acidi, possono interagire con gruppi funzionali polari dell'analita o dell'eluente. La topologia (sistemazione) di questi gruppi di silanolo in diverse preparazioni commerciali di silice spiega le loro diverse proprietà di separazione. Altri adsorbenti comunemente usati sono l'allumina e il carbone. Materiali basati su carbone, allumina o silice sono disponibili per la cromatografia a bassa pressione e per l'HPLC (Tab. 13.2). Mentre le silici sono acide e vanno bene per la separazione di materiali basici, le allumine sono più basiche e più adatte per la risoluzione di materiali acidi.

La selezione dell'eluente corretto (fase mobile) è indispensabile per una buona risoluzione perché essa influenza il fattore di capacità, K' , degli analiti (13.2.3). In genere, viene scelto un eluente con una polarità paragonabile a quella dell'analita più polare presente nella miscela. Quindi, gli alcol sarebbero selezionati se gli analiti contenessero gruppi idrossilici; l'acetone o gli esteri sarebbero scelti per gli analiti contenenti gruppi carbonilici, e gli idrocarburi come esano, eptano e toluene per gli analiti prevalentemente non-polari. Miscele di solventi vengono comunemente usate per l'eluizione in gradiente (13.3.6). La presenza di piccole quantità d'acqua nella fase mobile è spesso vantaggiosa quando la silice viene usata come fase stazionaria, poiché le molecole d'acqua bloccano in maniera selettiva i gruppi di silanolo più attivi, lasciando una popolazione di siti di legame più deboli.

La cromatografia per adsorbimento, che può essere eseguita sia su strato sottile sia in colonna, viene usata più comunemente per separare composti non-ionici, non solubili in acqua, come i trigliceridi, i PTH-aminoacidi (cap. 6, 6.4.3), le vitamine e molti farmaci.

13.5.2 Cromatografia su idrossiapatite

L'idrossiapatite cristallina ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) è un adsorbente usato per separare le miscele di proteine o gli acidi nucleici. Il meccanismo di adsorbimento non è stato ancora del tutto compreso, ma si ritiene che coinvolga sia gli ioni di calcio sia gli ioni di fosfato sulla superficie nonché le interazioni dipolo-dipolo e probabilmente le attrazioni elettrostatiche. Una delle più importanti applicazioni della cromatografia su idrossiapatite è la separazione di DNA a singolo filamento dal DNA a doppio filamento. Entrambe le forme di DNA legano a basse concentrazioni di tampone di fosfato, ma, quando la concentrazione di tampone viene au-

mentata, il DNA a singolo filamento viene staccato selettivamente. Quando la concentrazione di tampone viene ulteriormente aumentata, viene rilasciato il DNA a doppio filamento. Questo comportamento è sfruttato nella tecnica dell'analisi Cot (cap. 2, 2.3.1). L'affinità della idrossiapatite per il DNA a doppio filamento è così elevata che quest'ultimo può venir rimosso in maniera selettiva dall'RNA e dalle proteine in estratti di cellule usando questo tipo di cromatografia.

L'idrossiapatite è disponibile in commercio in una serie di forme adatte per l'PLC e l'HPLC. Queste includono l'idrossiapatite cristallina o sferoidale e forme collegate a una matrice di agarosio. La capacità di adsorbimento di tutte queste forme è massima attorno al pH neutro, e le condizioni includono solitamente 20 mM tampone di fosfato per il processo di adsorbimento. L'eluizione si ottiene aumentando la concentrazione del tampone fosfato a 500 mM.

13.5.3 Cromatografia per interazione idrofobica

Questo tipo di cromatografia fu sviluppato per purificare le proteine sfruttando la loro idrofobicità superficiale, che è collegata alla presenza di residui aminoacidi non-polari (cap. 6, 6.3.4). Gruppi di residui idrofobici sono sparpagliati sulla superficie delle proteine in un modo che fornisce proprietà caratteristiche a ogni proteina. In soluzione acquosa, queste regioni idrofobiche sulle proteine sono coperte da una pellicola ordinata di molecole d'acqua, che efficientemente maschera i gruppi idrofobici. Questi gruppi possono, comunque, venire esposti aggiungendo ioni salini, che sottraggono preferenzialmente le molecole di acqua ordinate. Le regioni idrofobiche esposte possono poi interagire l'una con l'altra e questo è il fenomeno alla base del *salting-out* (cap. 6, 6.3.4) ottenuto utilizzando il solfato di ammonio. Nella cromatografia per interazione idrofobica, piuttosto che facilitare l'interazione proteina-proteina esponendo i gruppi idrofobici, la presenza di gruppi idrofobici attaccati a una matrice adatta facilita l'interazione proteina-matrice. Le fasi stazionarie più comunemente usate sono formate da gruppi alchilici (esile, ottile) o da gruppi fenilici attaccati a una matrice di agarosio. Materiali commerciali includono Phenyl Sepharose e Phenyl SPW, entrambi per la cromatografia per interazione idrofobica a bassa pressione, e Bio-Gel TSK Phenyl e Sphergel TSK Phenyl per l'HPLC.

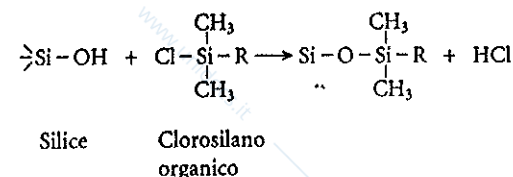
Dal momento che la cromatografia per interazione idrofobica richiede la presenza di composti che possano provocare il fenomeno del *salting-out*, come il solfato di ammonio, per facilitare l'esposizione delle regioni idrofobiche sulla molecola proteica, essa viene comunemente usata subito dopo il frazionamento con solfato di ammonio (cap. 6, 6.3.4), poiché gli ioni ammonio e solfato sono già presenti nel campione proteico. Per ottimizzare il processo, è vantaggioso adeguare il pH del campione proteico a quello del suo punto isoelettrico. Una volta che le proteine sono state adsorbite nella fase stazionaria, l'eluizione selettiva può essere ottenuta in vari modi, tra cui anche l'uso di un eluente di forza ionica gradualmente minore o con un aumento del pH (questo incrementa l'idrofilicità della proteina) o mediante uno spostamento selettivo da parte di uno spiazzatore che ha un'affinità per la fase stazionaria più forte di quella che ha la proteina. Alcuni esempi includono detergenti non-ionici come Tween 20 e Triton X-100, alcol alifatici, come il butanolo e l'etilenglicole, e ammine alifatiche come la butilammina. Uno dei potenziali problemi con la cromatografia per interazione idrofobica

è che alcune di queste condizioni di eluizione possono causare la denaturazione delle proteine. L'altro problema pratico presentato da questa tecnica è la sua non prevedibilità, poiché funziona bene per alcune proteine ma non per altre e uno studio preliminare è sempre necessario. Le proteine purificate da tale tecnica includono aldolasi, transferrina, citocromo *c* e ti-globulina.

13.6 Cromatografia di partizione

13.6.1 Principi teorici

Come altre forme di cromatografia, la cromatografia di partizione è basata sulle differenze nei fattori di capacità, k' , e nei coefficienti di distribuzione, K_d , degli analiti e utilizza fasi stazionarie e mobili liquide (13.23). Può essere suddivisa in cromatografia liquido-liquido, in cui la fase stazionaria liquida è attaccata alla matrice di supporto attraverso mezzi puramente fisici, e in cromatografia liquida a fase legata, in cui la fase stazionaria è legata covalentemente alla matrice. Un esempio di cromatografia liquido-liquido è quello in cui una fase stazionaria acquosa è legata a una matrice di cellulosa, amido o silice, composti che hanno tutti la capacità di legare fisicamente fino al 50% (peso/volume) di acqua rimanendo polveri a flusso libero. I vantaggi di questa forma di cromatografia consistono nel fatto che è economica, ha un'alta capacità e una larga selettività. Lo svantaggio sta nel fatto che il processo di eluizione può gradualmente rimuovere la fase stazionaria, alterando quindi le condizioni cromatografiche. Questo problema viene superato con le fasi legate, il che spiega il loro utilizzo sempre più diffuso. La maggior parte delle fasi legate usa silice come matrice, che viene derivatizzato per reazione con un organoclorosilano per immobilizzare la fase stazionaria:



L'eccesso di gruppi silanolo viene rimosso trattando con clorotrimetilsilano per migliorare la qualità della cromatografia minimizzando il fenomeno di scodamento (Fig. 13.3c). Ci sono due modi comunemente utilizzati di cromatografia di partizione, che differiscono nelle polarità relative delle fasi stazionaria e mobile e danno luogo alla cromatografia liquida in fase normale e alla cromatografia liquida in fase inversa.

13.6.2 Cromatografia liquida in fase normale

In questa forma di cromatografia, la fase stazionaria è polare e la fase mobile relativamente non-polare. La fase stazionaria più comune è un'alchilammina legata alla silice (Tab. 13.2). La fase mobile è generalmente un solvente organico, come esano, ottano, diclorometano o etilacetato. Il meccanismo della separazione sfrutta la capacità dell'analita di spostare molecole della fase mobile adsorbite come mostrato sulla superficie della fase stazionaria, così come la capa-

cità dell'analita di competere con le molecole della fase mobile nella formazione di un doppio strato sulla superficie della fase stazionaria. L'ordine di eluizione degli analiti è tale che il meno polare viene eluito per primo e il più polare per ultimo. Effettivamente, gli analiti polari richiedono generalmente un gradiente di eluizione con una fase mobile a polarità crescente, generalmente raggiunta usando metanolo o diossano. I principali vantaggi della cromatografia liquida in fase normale stanno nella sua capacità di separare analiti che hanno bassa solubilità in acqua e quelli che non sono trattabili con la cromatografia liquida in fase inversa.

13.6.3 Cromatografia liquida in fase inversa

In questa forma di cromatografia liquida, la fase stazionaria è non-polare e la fase mobile relativamente polare. Il tipo di gran lunga più utilizzato è quello a fase legata, in cui i gruppi alchil-silanic sono legati chimicamente alla silice. Sono utilizzati più frequentemente i gruppi silanici butile (C_4), ottile (C_8) e ottadecile (C_{18}) (Tab. 13.3). La fase mobile è comunemente acqua o tamponi acquosi, metanolo, acetonitrile, tetraidrofurano o miscele di questi. Ci si riferisce al solvente organico come modificatore organico. La cromatografia liquida in fase inversa differisce dalla maggior parte delle altre forme di cromatografia per il fatto che la fase stazionaria è essenzialmente inerte e sono possibili solo interazioni non-polari (idrofobiche) con gli analiti. La separazione cromatografica degli analiti è determinata principalmente dalle caratteristiche della fase mobile e coinvolge probabilmente una combinazione di meccanismi di adsorbimento e partizione. Si crede che ci siano molte similitudini con la cromatografia per interazione idrofobica. Non è stato descritto alcun modello semplice per spiegare la cromatografia in fase inversa; la teoria solvofobica è quella maggiormente considerata. È basata sul bilanciamento delle variazioni di energia libera ed entropia associate al legame dell'analita con la fase stazionaria e con la fase mobile. Ciò che attrae di più della tecnica in fase inversa è che piccoli cambiamenti nella composizione della fase mobile come l'aggiunta di sali, variazioni di pH o della quantità di solvente organico, influiscono profondamente sulle caratteristiche di separazione. In più, la tecnica è sensibile alle variazioni di temperatura in misura tale che un aumento di 10 °C dimezza approssimativamente il fattore di capacità, K' (13.2.3).

Tabella 13.3 Esempi di fasi legate per HPLC in fase inversa

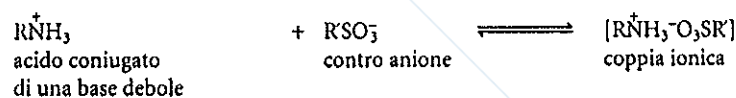
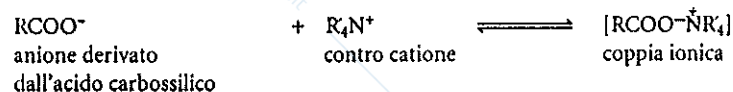
| Prodotto | Materiale | Dimensione della particella (μm) | Produttore |
|-------------------------------|---------------|---|------------|
| Sephacil C18 | Silice, C18 | 5 | Pharmacia |
| LiChrosorb PR18 | C18 | 5-10 | Merck |
| Zorbax ODS | C18 | 6 | DuPont |
| μ Bonda-Pak | C18 | 10 | Waters |
| Sephacil C8 | C8 | 5 | Pharmacia |
| Resolve C8 | C8 | 10 | Waters |
| μ Bonda-Pak Phenyl | Fenile | 10 | Waters |
| μ Bonda-Pak CN | C | 10 | Waters |
| μ Bonda-Pak NH_2 | NH_2 | 10 | Waters |

Nella cromatografia in fase inversa, gli analiti polari eluiscono per primi e quelli non-polari per ultimi. Gli analiti non polari necessitano di un gradiente di eluizione che utilizza proporzioni crescenti di un solvente a bassa polarità, come l'esano.

L'HPLC in fase inversa è probabilmente la forma di cromatografia più largamente utilizzata principalmente a causa della sua flessibilità e dell'alta risoluzione. È largamente impiegata per analizzare farmaci e i loro metaboliti, residui di insetticidi e di pesticidi, e gli aminoacidi. Adesso è anche applicata largamente alle proteine utilizzando l'FLPC. Le fasi di octadecilsilano (ODS) legano le proteine molto più fortemente di quello che fanno le fasi di octil- o metilsilano e hanno quindi più probabilità di provocare la denaturazione della proteina a causa delle condizioni più estreme richieste per l'eluizione della proteina. In forma non acquosa, la cromatografia in fase inversa può essere usata per separare i composti lipofili come i grassi.

13.6.4 Cromatografia liquida in fase inversa per accoppiamento ionico

La separazione di alcuni composti altamente polari, come gli aminoacidi, i peptidi, gli acidi organici e le catecolammine, che sono difficili da risolvere adeguatamente con la cromatografia convenzionale in fase inversa, può spesso essere migliorata utilizzando degli approcci alternativi. Il primo consiste nella soppressione ionica in cui la ionizzazione del composto viene soppressa eseguendo la cromatografia a un pH appropriatamente basso o alto. Gli acidi deboli, per esempio, possono essere separati usando una fase mobile acidificata. Il secondo approccio è l'accoppiamento ionico, in cui un contro-ione con carica opposta a quello da separare è aggiunto alla fase mobile in modo che la risultante coppia ionica abbia sufficiente carattere lipofilo per essere trattenuta dalla fase stazionaria non-polare di un sistema in fase inversa. Perciò, per facilitare la separazione dei composti acidi, che sarebbero presenti in forma di anioni coniugati, potrebbe essere utilizzato, come contro-ione, lo ione di un'alchilammina quaternaria, per esempio lo ione tetrabuttilammonio, mentre, per la separazioni delle basi, che sarebbero presenti come cationi, si potrebbe usare un alchilsolfonato, come il sodio eptansolfonato:



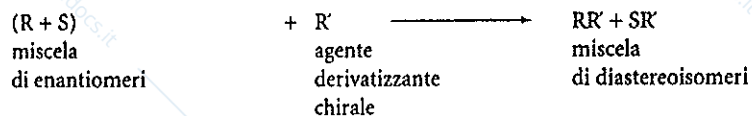
Il meccanismo per cui l'accoppiamento ionico dà luogo a una migliore separazione non è chiaro anche se sono state proposte due teorie. La prima suggerisce che la coppia ionica si comporta come una singola specie neutra; la seconda teoria suggerisce che venga prodotta una superficie attiva di scambio ionico in cui il contro-ione, avente considerevoli proprietà lipofile, e gli ioni, che devono essere separati, vengono assorbiti dalla fase stazionaria idrofobica non-polare. In pratica, il successo dell'approccio ad accoppiamento ionico è variabile e in qualche modo empirico. Le dimensioni del contro-ione, la sua concentrazione e il pH della soluzione sono tutti fattori che possono influenzare profondamente il risultato della separazione.

Le fasi legate con octil- e octadecilsilano sono usate molto comunemente insieme con la fase mobile acqua/metanolo o acqua/acetonitrile. Uno dei vantaggi della cromatografia in fase inversa ad accoppiamento ionico è che, se il campione che deve essere risolto contiene una miscela di composti ionici e non ionici, i due gruppi possono essere separati contemporaneamente in quanto il reagente di accoppiamento ionico non influisce sulla cromatografia delle specie non ioniche. Questo non è vero per la cromatografia a scambio ionico.

13.6.5 Cromatografia chirale

I composti chirali contengono come minimo un atomo di carbonio asimmetrico o sono molecularmente asimmetrici. Esistono in due forme enantiomorfe, una l'immagine speculare dell'altra, che hanno le stesse proprietà fisiche e chimiche e differiscono solo nella loro interazione con il piano della luce polarizzata, facendolo ruotare una in senso destrogiro (+) e l'altra in senso levogiro (-). C'è una serie di convenzioni per indicare la configurazione spaziale, in relazione alle proprietà ottiche, degli enantiomeri. Il sistema classico D e L per i monosaccaridi e gli aminoacidi non può essere applicato facilmente ad altre strutture; il sistema Cahn-Ingold-Prelog, che assegna la configurazione R (*rectus*) o S (*sinister*) a un enantiomero, è quello che viene usato più frequentemente. Fino a poco tempo fa non era possibile risolvere miscele di enantiomeri e questo creava problemi all'industria farmaceutica e nello sviluppo dell'uso clinico dei farmaci, molti dei quali sono chirali, e, sebbene gli enantiomeri abbiano proprietà chimiche e fisiche identiche, sono distinguibili da un punto di vista biologico. Perciò essi differiscono nella capacità di interagire con i recettori coinvolti in una serie di risposte fisiologiche e sono spesso metabolizzati ed escreti con velocità diverse.

Sono state sviluppate di recente tecniche cromatografiche che permettono di risolvere miscele di enantiomeri. Una di queste tecniche si basa sul fatto che i diastereoisomeri, isomeri ottici che non sono l'uno l'immagine speculare dell'altro, differiscono nelle proprietà fisiche, anche se contengono gruppi funzionali identici. Essi possono quindi essere separati per mezzo delle tecniche di cromatografia convenzionali, il più delle volte con la cromatografia in fase inversa (13.6.3). L'approccio dei diastereoisomeri richiede che gli enantiomeri contengano un gruppo funzionale che possa essere derivatizzato da un agente derivatizzante chirale (CDA, *Chiral Derivatizing Agent*), chimicamente e otticamente puro, per convertirli in una miscela di diastereoisomeri.



Esempi di CDA includono le forme R o S dei seguenti composti:

| | |
|--------------------------------------|--|
| Per le ammine | N-trifluoroacetil-L-prolilcloruro, anidride α -fenilbutirrica |
| Per gli alcoli | 2-Fenilpropionil cloruro, 1-feniletilisotiocianato |
| Per i chetoni | 2,2,2-Trifluoro-1-pentiletildiazina |
| Per gli acidi alifatici e aliciclici | 1-mentolo, desossiefedrina |

Sebbene questo approccio alla risoluzione chirale sia abbastanza semplice, è essenziale che il processo di derivatizzazione sia rapido e quantitativo. Molto spesso non è così e questo ha limitato l'uso di tale metodo. Un approccio alternativo al problema della risoluzione consiste nell'usare una fase chirale mobile. In questa tecnica, un complesso diastereoisomerico transiente viene formato tra gli enantiomeri e l'agente chirale nella fase mobile. Esempi di agenti chirali nella fase mobile includono l'albumina, la glicoproteina acida α_1 , le α -, β -, e γ -ciclodestrine, l'acido 10-canforsolfonico e la N-benzossicarbonilglicil-L-prolina, tutti utilizzati con un sistema cromatografico in fase inversa.

L'approccio con maggiore successo alla cromatografia chirale, comunque, passa attraverso l'utilizzo di una fase stazionaria chirale e si basa sul principio che la necessità di un'interazione a tre punti tra fase stazionaria (che funziona come discriminatore chirale) e l'enantiomero permette la risoluzione di miscele racemiche a causa del diverso arrangiamento spaziale dei gruppi funzionali al centro chirale negli enantiomeri. Uno di questi approcci che ha avuto successo usa le fasi di Pirkle, basate sui derivati dinitrobenzoici degli aminoacidi, come la fenilglicina, che sono legati alla silice; si pensa che queste fasi funzionino permettendo la formazione di complessi tra enantiomero e fase stazionaria transienti, coinvolgendo legami idrogeno e forze di van der Waals. L'eluizione viene generalmente eseguita con la tecnica in fase inversa. Fasi chirali stazionarie alternative includono triacetilcellulosa e varie ciclodestrine legate alla silice. Queste ciclodestrine sono oligosaccaridi ciclici che hanno una struttura a tronco di cono aperta, larga alla base da 6 a 8 Å (da 0,6 a 0,8 mm). La loro superficie interna è in prevalenza idrofobica, ma ci sono gruppi ossidrilici secondari localizzati attorno alla larga apertura del cono. La β -ciclodestrina ha 7 unità glucopiranosiche e contiene 35 centri chirali; l' α -ciclodestrina ha 6 unità glucopiranosiche, 30 centri chirali ed è più piccola della β -ciclodestrina. Nell'insieme ci si riferisce a loro come fasi a cavità chirale perché dipendono dalla capacità dell'enantiomero di entrare nella gabbia tridimensionale della ciclodestrina, mentre allo stesso tempo presentano gruppi funzionali e quindi il centro chirale per l'interazione con gruppi ossidrilici all'apertura del cono. Enantiomeri che possiedono anelli aromatici a cinque, sei, sette membri sono stati risolti con questo approccio, unito all'eluizione in fase inversa. Un'innovazione più recente consiste nell'uso degli antibiotici macrociclici, vancomicina e teicoplanina, come fasi chirali stazionarie. La vancomicina ha 18 centri chirali, la teicoplanina 23. Sono state usate entrambe con successo nelle separazioni chirali normali o in fase inversa.

Poiché le proteine sono otticamente attive, possono in principio essere utilizzate come fase chirale stazionaria. Sono state utilizzate l'albumina di siero bovino e la glicoproteina acida α_1 (AGP); si è dimostrato che funzionano con successo per numerose separazioni, anche se il loro meccanismo di separazione è scarsamente conosciuto. Sia l'albumina sia l'AGP si trovano nel plasma e si sa che legano i farmaci (Fig. 13.11). L'albumina ha come minimo due siti di legame distinti ai quali si possono legare i farmaci acidi e basici. L'AGP ha un solo sito di legame per i farmaci ristretto al legame di farmaci basici come il propanololo. Queste fasi chirali proteiche sono usate insieme a tamponi acquosi e non possono essere utilizzate a valori estremi di pH o in presenza di solventi organici.

13.6.6 Cromatografia controcorrente (CCC, Counter-Current Chromatography)

Questo processo di separazione si basa sulla distribuzione di un composto tra due fasi liquide immiscibili. Queste fasi possono essere miscele di solventi organici, tamponi, sali e vari

Tabella 13.6 Esempi di ligandi gruppo-specifici utilizzati in cromatografia di affinità

| Ligando | Affinità: |
|--------------------------|---|
| Nucleotidi | |
| 5'-AMP | Deidrogenasi NAD ⁺ -dipendenti, alcune chinasi |
| 2' 5'-ADP | Deidrogenasi NAD ⁺ -dipendenti |
| Calmodulina | Enzimi che legano la calmodulina |
| Avidina | Enzimi che contengono la biotina |
| Acidi grassi | Proteine che legano gli acidi grassi |
| Eparina | Lipoproteine, lipasi, fattori di coagulazione, DNA polimerasi, recettori proteici per gli steroidi, fattori di crescita, inibitori delle serin proteasi |
| Proteine A e G | Immunoglobuline |
| Concanavalina A | Glicoproteine contenenti residui di α-D-mannopiranosile e di α-D-glucopiranosile |
| Lectina di germe di soia | Glicoproteine contenenti residui di N-acetil-α-(α β)-galattopiranosile |
| Fenilboronato | Glicoproteine |
| Poli (A) | RNA contenente sequenze poli (U), alcune proteine RNA specifiche |
| Lisina | rRNA |
| Cibacron Blue F3G-A | Enzimi dipendenti da nucleotidi, fattori di coagulazione |

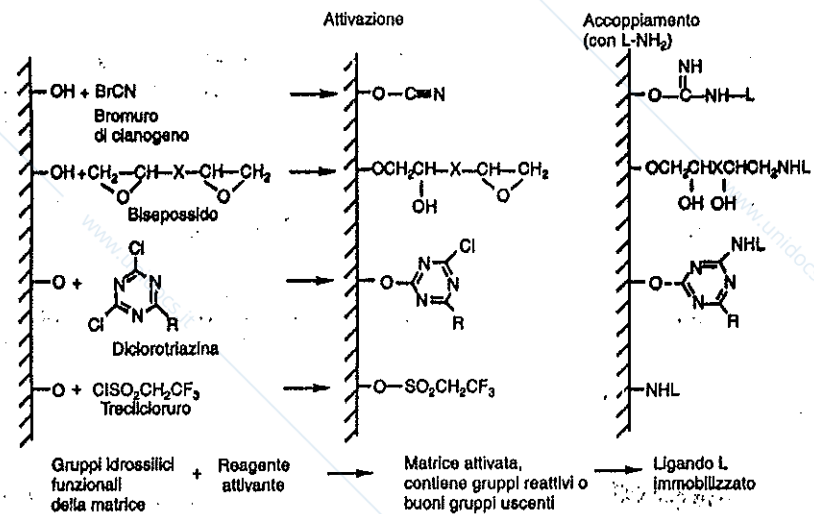


Figura 13.15 Esempi di reazioni di accoppiamento utilizzate per immobilizzare ligandi (L) in cromatografia d'affinità. Se un braccio spaziatore deve essere introdotto tra il ligando immobilizzato e la matrice, l'accoppiamento chimico è simile.

Una volta che il campione è stato applicato e la macromolecola legata, la colonna viene eluita con un eccesso di tampone per rimuovere i contaminanti non specificamente legati.

Il composto purificato viene recuperato dal ligando o per eluizione specifica o per eluizione non specifica. L'eluizione non specifica si può ottenere mediante una variazione di pH o di forza ionica. Un'eluizione per variazione di pH, che utilizza acido acetico diluito o idrossido d'ammonio, si verifica per una variazione nello stato di ionizzazione di gruppi, nel ligando e/o nella macromolecola, che sono critici per il legame ligando-macromolecola. Una variazione nella forza ionica, non necessariamente con una concomitante variazione nel pH, causa anch'essa eluizione dovuta a rottura dell'interazione ligando-macromolecola; a questo scopo viene frequentemente utilizzato NaCl 1M. Se l'eluizione viene raggiunta mediante una variazione di pH, il pH delle frazioni raccolte deve essere riportato a un valore ottimale tale da minimizzare la possibilità di denaturazione proteica. L'eluizione d'affinità coinvolge l'aggiunta di un'alta concentrazione di substrato, o di inibitore reversibile della macromolecola se questa è un'enzima, o l'aggiunta di ligandi per i quali la macromolecola abbia un'affinità maggiore di quella che ha per il ligando immobilizzato. Il materiale purificato è infine recuperato in una soluzione tamponata che può perciò contenere agenti di eluizione specifici o alte concentrazioni di sali; queste sostanze devono essere rimosse affinché l'isolamento sia completo mediante tecniche come la cromatografia a esclusione.

13.9.3 Applicazioni

Mediante la cromatografia d'affinità sono stati purificati molti enzimi e proteine, inclusi i recettori e le immunoglobuline. L'applicazione di questa tecnica è limitata solo dalla disponibilità dei ligandi da immobilizzare. I principi sono stati estesi agli acidi nucleici e hanno dato un contributo considerevole agli sviluppi nella biologia molecolare. L'RNA messaggero, per esempio, viene isolato di routine per ibridazione selettiva su poli (U)-Sepharose 4B, sfruttando la sua coda poli (A). Si può usare DNA a singola elica immobilizzato per isolare il DNA e l'RNA complementare. Anche se questa separazione può essere ottenuta in colonna, viene di solito eseguita usando DNA a singola elica immobilizzato su filtri di nitrocellulosa. I nucleotidi immobilizzati sono utili per l'isolamento delle proteine coinvolte nel metabolismo degli acidi nucleici.

Uno sviluppo molto utile della cromatografia d'affinità è il suo uso per la separazione di una miscela di cellule in popolazioni omogenee. La tecnica si basa sulle proprietà antigeniche della superficie cellulare, sulla natura chimica dei carboidrati esposti sulla superficie cellulare o su un'interazione specifica recettore di membrana-ligando. I ligandi immobilizzati utilizzati includono la proteina A, che si lega alla regione Fc delle IgG, una lectina o un ligando specifico per un recettore di membrana.

13.9.4 Cromatografia di affinità con lectine

Le lectine sono un gruppo di proteine, prodotte da animali, piante e muffe, che hanno la capacità di legare carboidrati e quindi glicoproteine. Hanno una struttura polimerica, spesso tetramerica. Le loro sottounità possono essere identiche, nel qual caso riconoscono uno specifico residuo saccaridico, o costituite di due tipi, nel qual caso riconoscono due diversi sac-

caridi. Hanno tutte una M_r compresa nell'intervallo da 40000 a 400000. La loro capacità di riconoscere e legare zuccheri specifici le ha rese di grande valore nella purificazione delle glicoproteine, in particolare dei recettori proteici di membrana.

Le lectine più largamente utilizzate in cromatografia sono quelle delle piante leguminose (piselli, fagioli, semi di soia) a causa della loro abbondanza. Possono essere immobilizzate su matrici di agarosio mediante tecniche convenzionali e molte sono ora disponibili in commercio. Se la natura del componente saccaridico di una glicoproteina non è conosciuta, la lectina scelta viene selezionata mediante una semplice procedura di screening. Una volta che le glicoproteine sono state legate alla lectina immobilizzata, l'eluizione può essere raggiunta in una serie di modi: per esempio, con un'eluizione per affinità usando il semplice monosaccaride per il quale la lectina ha affinità oppure con un tampone borato che forma un complesso con la glicoproteina, oppure mediante un'accurata variazione del pH (non sotto pH 3 o sopra pH 10); per aggiunta di un reagente come il glicol etilenico per ridurre l'interazione idrofobica del ligando. Uno dei maggiori vantaggi della cromatografia d'affinità con lectine è che può essere eseguita in presenza di concentrazioni di sali relativamente alte perché non si basa sulle interazioni ioniche. In linea di principio, quindi, può essere applicata direttamente dopo il frazionamento con sali. È anche stata utilizzata per separare miscele di cellule sfruttando i componenti saccaridici delle loro membrane esterne. La maggior parte delle applicazioni della cromatografia d'affinità con lectine è stata eseguita usando LPLC convenzionale.

13.9.5 Cromatografia di immunoaffinità

L'uso di anticorpi come ligandi immobilizzati è stato sfruttato nell'isolamento e nella purificazione di numerose proteine che includono quelle di membrana di origine virale. Gli anticorpi monoclonali possono essere legati a matrici di agarosio mediante la tecnica del bromuro di cianogeno. Il legame della proteina all'anticorpo immobilizzato avviene in una soluzione tampone a pH neutro contenente moderate concentrazioni di sale. L'eluizione della proteina legata richiede, abbastanza spesso, condizioni estreme a causa del legame molto forte con l'anticorpo ($K_d \approx 10^{-8}$ a 10^{-12} M) e questo può portare alla denaturazione della proteina. Esempi di procedure di eluizione includono l'uso di alte concentrazioni di sali con o senza l'uso di detergenti o di urea, sodio dodecilsolfato o cloruro di guanidina, tutti in grado di determinare denaturazione. L'uso di agenti caotropici, come tiocianato, perclorato e trifluoroacetato, o l'abbassamento del pH a circa 3 può evitare la denaturazione.

13.9.6 Cromatografia con chelati di metalli (cromatografia di affinità con metalli immobilizzati)

Questa è una forma speciale di cromatografia d'affinità in cui uno ione metallico immobilizzato, come Cu^{2+} , Zn^{2+} , Hg^{2+} o Cd^{2+} , o uno ione di un metallo di transizione, come Co^{2+} , Ni^{2+} o Mn^{2+} , viene utilizzato per legare selettivamente le proteine per reazione con i gruppi imidazolo di residui cisteinici, con i gruppi tiolo dei residui di cisteina e con i gruppi indolo dei residui di triptofano. L'immobilizzazione della proteina coinvolge la formazione di un legame di coordinazione che deve essere sufficientemente stabile per permettere l'attacco della proteina e la sua ritenzione durante l'eluizione del materiale contaminante non

legato. Il seguente rilascio della proteina può essere ottenuto o, semplicemente, abbassa il pH, quindi destabilizzando il complesso proteina-metallo, oppure con l'uso di agenti complessanti come l'EDTA. Più comunemente, l'atomo metallico viene immobilizzato legando l'agarosio sostituito con iminodiacetato o tris(carbossimetil)etilendiammina. Le proteine purificate con questa tecnica includono il fibrinogeno, la superossido dismutasi e le proteine nucleari non-istoniche.

13.9.7 Cromatografia con ligandi colorati

Una serie di coloranti triazinici, che contengono sia anelli coniugati sia gruppi ionici, hanno la capacità di legare alcune proteine. Il termine pseudo-ligandi viene utilizzato per descrivere questi coloranti. Non è possibile prevedere se una particolare proteina si legherà a un dato colorante, in quanto l'interazione non è specifica, ma si pensa coinvolga l'interazione ligando-domini di legame attraverso forze ioniche e idrofobiche. Il legame dei coloranti alle proteine esalta i loro legami con materiali come Sepharose 4B e ciò viene sfruttato nel processo di purificazione. Ciò che attrae di questa tecnica è che i coloranti sono economici, si adattano facilmente alle matrici convenzionali e sono molto stabili. Il colorante utilizzato più comunemente è Cibacron Blue F3G-A. La selezione del colorante per la purificazione di una particolare proteina è empirica e viene eseguita sulla base di vari tentativi. Il legame della proteina al colorante immobilizzato viene generalmente raggiunto a un pH da 7 a 8.5. L'eluizione viene comunemente eseguita mediante gradiente salino o per affinità (spostamento).

13.9.8 Cromatografia covalente

Questa forma di cromatografia è stata sviluppata specificatamente per separare tioli (contenenti proteine sfruttando la loro interazione con un ligando immobilizzato che presenta un gruppo disolfuro. Il principio viene illustrato nella figura 13.16. Il ligando più comunemente utilizzato è un gruppo 2'-piridil disolfuro legato a una matrice di agarosio, come Sepharose 4B. Dalla reazione con la proteina contenente tiolo, viene rilasciato piridin-2-tione. Questo processo viene seguito spettrofotometricamente a una lunghezza d'onda di 343 nm, il che permette quindi di seguire l'assorbimento della proteina. Una volta che la proteina si lega covalentemente alla matrice, i contaminanti che non contengono tiolo vengono eluiti e i gruppi tiopiridilici che non hanno reagito vengono rimossi usando ditiotreitolo o mercaptoetanolina 4 mM. La proteina viene quindi rilasciata per sostituzione con un composto contenente tiolo come il ditiotreitolo, il glutatione ridotto o la cisteina 20-50 mM. Viene infine rigenerata la matrice per reazione con 2,2'-dipiridilsolfuro. Questo metodo è stato usato con successo per molte proteine anche se il suo uso è limitato dai costi e dallo stadio di rigenerazione piuttosto complicato. Può tuttavia essere applicato alle preparazioni di proteine molto impure.

13.10 Cromatografia gas-liquido (GLC, Gas-Liquid Chromatography)

13.10.1 Apparato e materiali

Questa tecnica, basata sulla partizione dei composti tra una fase liquida e una gassosa, viene largamente utilizzata per l'analisi qualitativa e quantitativa di un grande numero di com-

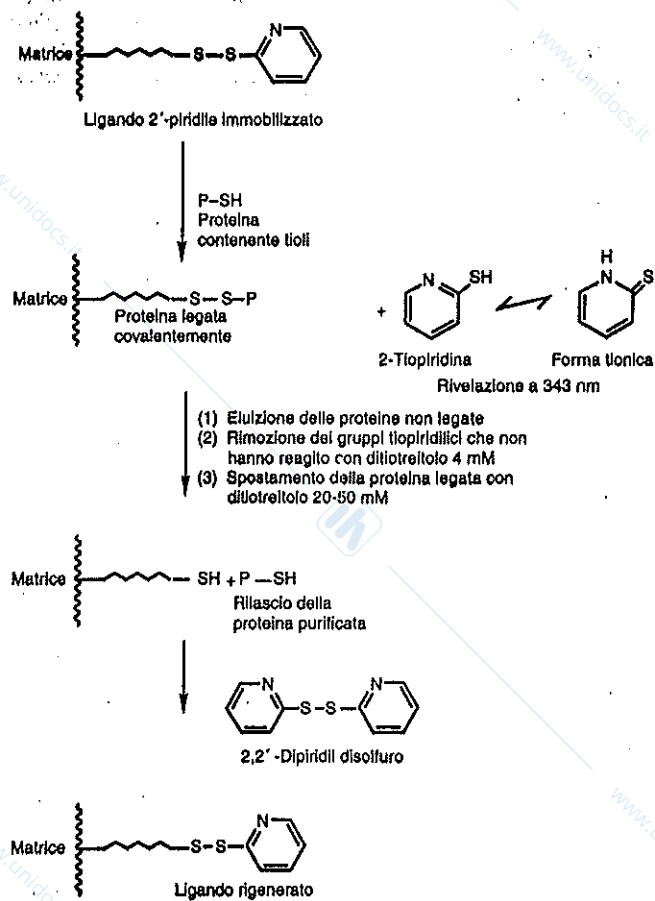


Figura 13.16 Principi della cromatografia covalente.

posti in quanto ha elevata sensibilità, riproducibilità e velocità di risoluzione. È stato provato che è di grande valore soprattutto per la separazione di composti che hanno una polarità relativamente bassa. Una fase stazionaria di un liquido a elevato punto di ebollizione, come la resina di silicone, è supportata su un solido granulare inerte. Questo materiale viene impaccato in una stretta colonna a spirale di vetro o di acciaio lunga da 1 a 3 m e avente un diametro interno da 2 a 4 mm, attraverso la quale viene fatto passare un carrier costituito da un gas inerte (la fase mobile), come l'azoto, l'elio o l'argon. La colonna viene tenuta in una stufa a elevata temperatura, che assicura che i composti che devono essere separati siano allo stato di

vapore e che i tempi di analisi siano ragionevoli (13.10.3). La separazione si basa sulla differenza nei coefficienti di partizione dei composti volatilizzati tra le fasi liquida e gassosa che si instaura quando i composti sono trasportati attraverso la colonna dal gas carrier. Man mano che i composti lasciano la colonna passano attraverso un rivelatore che è collegato, mediante un amplificatore, a un registratore su carta, che, a sua volta, registra un picco ogni volta che un analita passa attraverso il rivelatore (Fig. 13.17).

La cromatografia gas-liquido (GLC) può anche essere eseguita usando colonne capillari, fatte di vetro o di metallo, con diametri tra 0.03 e 1.0 mm e che possono essere lunghe fino a 100 m. In cromatografia di adsorbimento vengono utilizzati due tipi di sistemi di colonne capillari noti come colonne tubolari aperte a parete ricoperta (WCOT, *Wall-Coated Open Tubular*) e colonne tubolari aperte a supporto ricoperto (SCOT, *Support-Coated Open Tubular*), anche note come colonne tubolari aperte a strato poroso (PLOT, *Porous Layer Open Tubular*). Nelle colonne WCOT la fase stazionaria ricopre direttamente le pareti del tubo capillare. Poiché c'è solo una piccola quantità di fase stazionaria presente, possono essere sottoposte a cromatografia solo piccole quantità di campione. Di conseguenza deve essere utilizzato un sistema di deviazione nel punto di iniezione del campione in modo che solo una piccola frazione del campione iniettato raggiunga la colonna. Il resto del campione è indirizzato allo scarico. La realizzazione del sistema di deviazione è un punto critico nell'analisi quantitativa in quanto esso deve assicurare che il rapporto tra il campione cromatografato e il campione scartato sia sempre lo stesso. Alcuni strumenti sono equipaggiati con iniettori sulla colonna che richiedono una considerevole abilità per essere utilizzati.

Nelle colonne SCOT un materiale di supporto è legato alle pareti della colonna capillare e la fase stazionaria ricopre tale supporto. La capacità delle colonne SCOT è considerevolmente più alta rispetto a quella delle colonne WCOT, e di conseguenza si possono iniettare piccoli

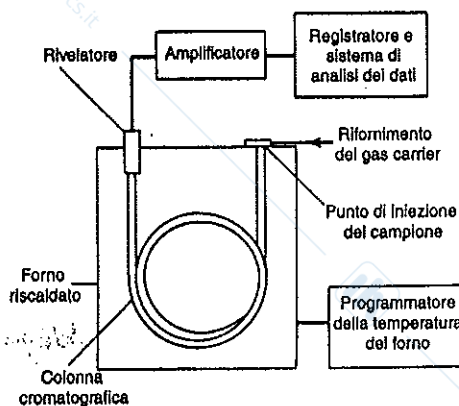


Figura 13.17 Schema di un sistema GLC.

campioni direttamente nelle colonne senza la necessità di un sistema di deviazione. I sistemi SCOT sono quindi decisamente più semplici da utilizzare per l'analisi quantitativa di quanto lo siano i sistemi WCOT. La loro efficienza è inferiore a quella dei sistemi WCOT, ma considerevolmente migliore di quella delle colonne GLC convenzionali. In termini generali, le colonne PLOT hanno scarse applicazioni biologiche.

L'efficienza di una colonna GLC è determinata dai principi descritti nel paragrafo 13.2. Occorre una velocità di flusso ottimale del gas carrier per avere la massima efficienza di colonna (minimo valore di H). Per le colonne capillari, il massimo numero di piatti teorici che può essere ottenuto è indipendente dal gas carrier utilizzato. In questi casi, una diminuzione del diametro della colonna dovrebbe dare un aumento proporzionale del numero di piatti per unità di lunghezza, cioè di H . Poiché queste colonne sono molto più lunghe di quelle convenzionali, si ottengono efficienze molto alte (equazioni dalla 13.8 alla 13.12) e questi sistemi sono molto utili per l'analisi di miscele complesse.

Matrici

Dal momento che esse vengono utilizzate per fornire una superficie di supporto che viene ricoperta dallo strato di fase stazionaria, è importante che il supporto sia inerte verso il campione. Ciò non è generalmente un problema quando il supporto trattiene uno strato ad alta percentuale di fase stazionaria, ma, se la percentuale di rivestimento è bassa, l'esposizione del supporto al campione spesso ostacola la separazione. Il supporto comunemente più utilizzato è la Celite (silice di diatomee), che, a causa del problema dell'interazione supporto-campione, viene spesso trattata in modo da modificare i gruppi idrossilici che si trovano in essa. Ciò si ottiene normalmente per silanizzazione del supporto con composti come l'esa-metil-disilazano. In aggiunta al supporto, vengono sottoposte a silanizzazione anche la colonna di vetro, il tappo di lana di vetro, che si trova alla base della colonna, e qualsiasi altra superficie che può venire in contatto con il campione. Le particelle di supporto hanno dimensioni uniformi che, per la maggioranza delle applicazioni pratiche, sono 60-80, 80-100 o 100-120 mesh (13.3.3).

Fasi stazionarie

Qualsiasi fase stazionaria per GLC deve avere i seguenti requisiti: essere non volatile e stabile termicamente alla temperatura utilizzata per l'analisi. Spesso le fasi utilizzate sono composti organici con elevato punto di ebollizione, che rivestono il supporto in proporzioni dall'1% al 25%, a seconda dell'analisi. Queste fasi sono di due tipi: selettive, in cui la separazione avviene sfruttando le diverse caratteristiche chimiche dei componenti, o non selettive, dove la separazione viene ottenuta sulla base di differenze nei punti di ebollizione dei componenti il campione. La temperatura operativa dell'analisi deve essere compatibile con la fase scelta. Temperature troppo alte risultano in un eccessivo rilascio da parte della colonna dovuto alla volatilizzazione della fase stazionaria, il che provoca la contaminazione del rivelatore e dà una linea di base instabile nel registratore. La scelta della fase stazionaria per l'analisi dipende dal composto in analisi e viene decisa, nel migliore dei modi, facendo riferimento alla letteratura. Fasi stazionarie comunemente utilizzate includono i glicoli polietilenici, le gomme di metilfenil- e metilvinilsilicone (le cosiddette fasi OV), l'Apiezon L e gli esteri dell'acido

adipico, succinico e ftalico. Le fasi basate sulle β -Ciclodestrine sono disponibili per separazioni chirali (13.6.5).

Le colonne sono impaccate a secco sotto una leggera pressione di gas e, dopo l'impaccamento, devono essere condizionate, per un tempo che va dalle 24 alle 48 ore, per riscaldamento a una temperatura vicina al limite operativo superiore, mentre il gas carrier viene fatto passare attraverso la colonna alle normali velocità di flusso. Durante questo condizionamento, la colonna non deve essere connessa al rivelatore, per prevenire la contaminazione. Con fasi liquide di buona qualità, il condizionamento della colonna può essere semplificato facendo fluire il gas carrier a 100 °C.

13.10.2 Preparazione e applicazione del campione

La maggior parte dei composti non polari, o a bassa polarità, è applicabile direttamente in GLC mentre altri composti, che possiedono gruppi polari come $-\text{OH}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{COOH}$, sono generalmente trattenuti dalla colonna per periodi di tempo eccessivi se vengono applicati direttamente. Questa eccessiva ritenzione è accompagnata inevitabilmente a una bassa risoluzione e a scodamento dei picchi (13.2.4). Il problema può essere superato per derivatizzazione dei gruppi polari. Ciò aumenta la volatilità e i coefficienti di distribuzione effettivi dei composti. La metilazione, la silanizzazione e la perfluoroacilazione sono metodi di derivatizzazione comuni per gli acidi grassi, i carboidrati e gli aminoacidi.

Il campione per la cromatografia viene dissolto in un solvente adatto, come l'acetone, l'etano o il metanolo. I solventi organici cloridati vengono in genere evitati in quanto contaminano il rivelatore. Il campione viene iniettato sulla colonna utilizzando una microsiringa attraverso un setto nel punto di iniezione che si trova in cima alla colonna. Normalmente vengono iniettati da 0.1 a 10 mm^3 di soluzione. È pratica comune mantenere la zona di iniezione della colonna a una temperatura leggermente più alta di quella della colonna stessa in quanto questo aiuta ad assicurare una rapida e completa volatilizzazione del campione. In molti strumenti in commercio l'iniezione del campione è automatizzata.

13.10.3 Condizioni di separazione

L'azoto, l'elio e l'argon sono i tre gas carrier più utilizzati. Vengono fatti passare attraverso la colonna a una velocità di flusso che va da 40 a 80 $\text{cm}^3 \text{min}^{-1}$. La temperatura della colonna deve essere all'interno dell'intervallo di lavoro della particolare fase stazionaria e viene scelta in modo da trovare un compromesso tra tempo di ritenzione di picco e risoluzione. Nella GLC, i coefficienti di partizione sono particolarmente sensibili alla temperatura; in questo modo i tempi di analisi possono essere determinati regolando la temperatura del forno, cosa che può essere fatta in due modi. Nell'analisi isotermica viene impiegata una temperatura costante. Nella separazione dei composti che differiscono molto per polarità o M_r , può essere vantaggioso aumentare la temperatura gradualmente. Ci si riferisce a questo come alla programmazione della temperatura. Ciò, però, determina spesso una perdita eccessiva della fase stazionaria quando la temperatura viene aumentata, con seguente variazione della linea di base. Di conseguenza alcuni strumenti hanno due colonne e due rivelatori identici, una coppia dei quali viene usata come riferimento. Le correnti dai due rivelatori sono opposte; quindi,

RISPOSTA

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W} \right)^2$$

$$(1) N = 16 \left(\frac{465}{30} \right)^2, \text{ quindi } N = 3844$$

$$(2) H = \frac{L}{N} = \frac{7.5 \times 10^{-4}}{3844}, \text{ quindi } H = 19.5 \mu\text{m}$$

DOMANDA 3

Due composti (1 e 2) con coefficienti di distribuzione di 10 e 12 devono essere separati su una colonna in cui il volume della fase stazionaria è un quinto di quello della fase mobile. Calcolare il numero di piatti teorici necessari per dare una risoluzione di 1.5.

RISPOSTA

$$k' = K_d \frac{V_S}{V_M}$$

$$k'_1 = 10 \times \frac{1}{5}, \text{ quindi } k'_1 = 2$$

$$k'_2 = 12 \times \frac{1}{5}, \text{ quindi } k'_2 = 2.4$$

$$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1} = \frac{2.4}{2} = 1.2$$

$$R_S = \left(\frac{\sqrt{N}}{4} \right) \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k'_2}{1 + k'_{av}} \right)$$

$$1.5 = \left(\frac{\sqrt{N}}{4} \right) \left(\frac{0.2}{1.2} \right) \left(\frac{2.4}{1 + 2.2} \right)$$

Quindi $N = 2304$

DOMANDA 4

Due composti A e B sono stati separati su una colonna lunga 25 cm. I tempi di ritenzione osservati sono stati di 7 min 20 s e 8 min 20 s rispettivamente. La larghezza di base del picco per l'analita B era 10 s. Quando è stato studiato un composto di riferimento, che era completamente escluso dalla fase stazionaria sotto le stesse condizioni di eluizione, si è trovato che il suo tempo di ritenzione era di 1 min 20 s.

Calcolare:

- (1) il tempo di ritenzione corretto per A e B;
- (2) il fattore di capacità per A e B;
- (3) il fattore di selettività per i due composti;

- (4) il numero di piatti teorici nella colonna;
- (5) la risoluzione dei due composti;
- (6) la lunghezza di colonna necessaria per raddoppiare la risoluzione.

RISPOSTA

$$(1) t'_R = t_R - t_M$$

$$(A) t'_R = 440 - 80 = 360 \text{ s}$$

$$(B) t'_R = 500 - 80 = 420 \text{ s}$$

$$(2) k' = \frac{t'_R}{t'_M}$$

$$(A) k'_A = \frac{360}{80} = 4.5$$

$$(B) k'_B = \frac{420}{80} = 5.25$$

$$(3) \alpha = \frac{k'_B}{k'_A} = \frac{5.25}{4.5} = 1.167$$

$$N = \left(\frac{t'_R}{W} \right)^2$$

$$(4) \text{ Per B } N = \left(\frac{420}{10} \right)^2 = 1764$$

$$(5) R_S = \left(\frac{\sqrt{N}}{4} \right) \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k'_B}{1 + k'_{av}} \right)$$

$$= \left(\frac{\sqrt{1764}}{4} \right) \left(\frac{0.167}{1.167} \right) \left(\frac{5.25}{1 + 4.875} \right)$$

$$= 1.34$$

$$(6) H = \frac{L}{N} = \frac{250}{1764} = 0.14 \text{ mm}$$

$$\text{Per } R_S = 2.38, N = 7025$$

$$0.14 = \frac{L}{7025}, \text{ quindi } L = 983.5 \text{ mm oppure } 98.35 \text{ cm}$$

DOMANDA 5

La massa molecolare relativa (M_r) di una proteina è stata studiata mediante cromatografia di esclusione utilizzando una colonna Sephacryl S300 e usando come standard l'aldolasi, la catalasi, la ferritina, la tiroglobulina e il Blue Dextrano. Si sono ottenuti i seguenti dati di eluizione.