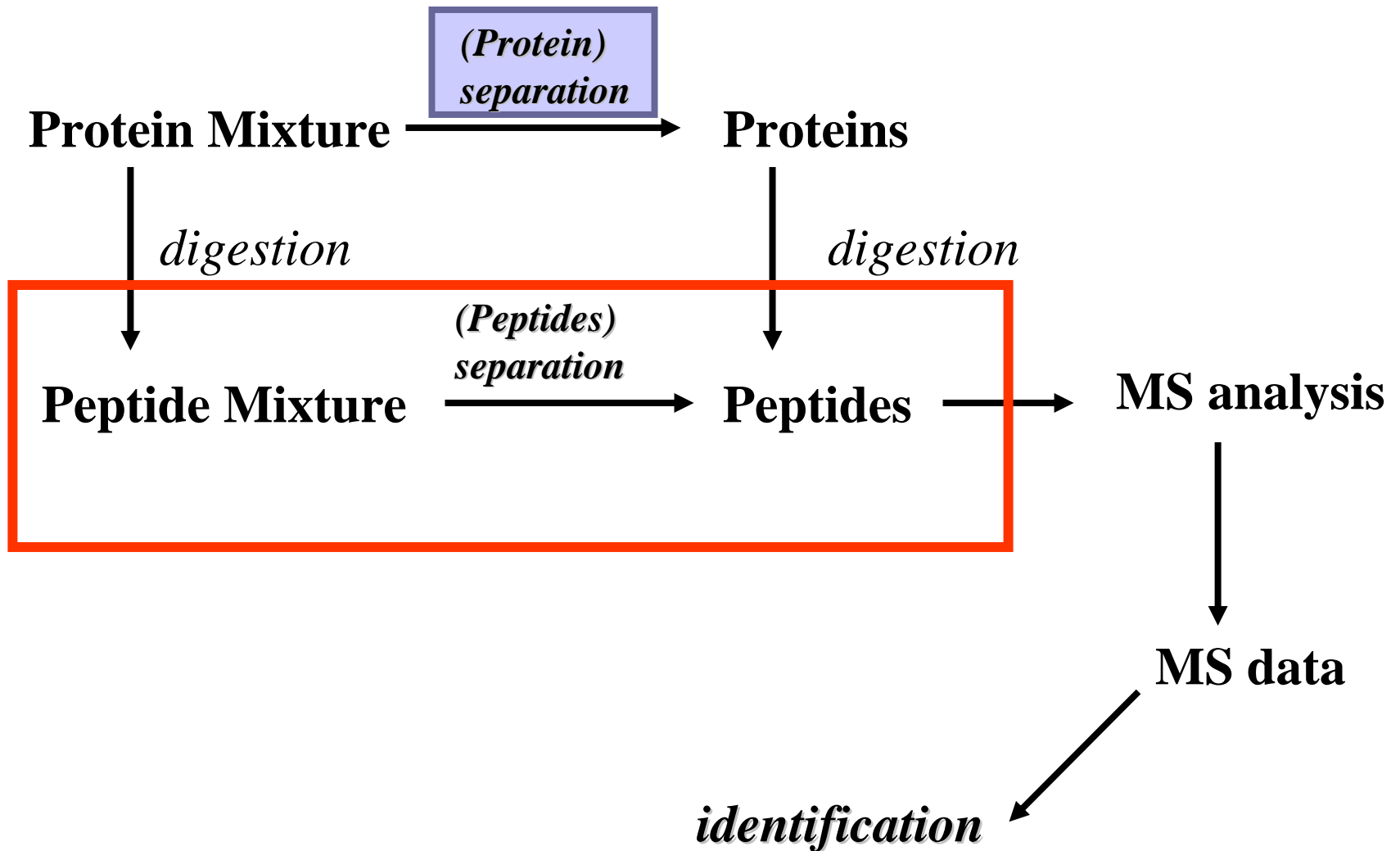


# General scheme of proteomic analysis



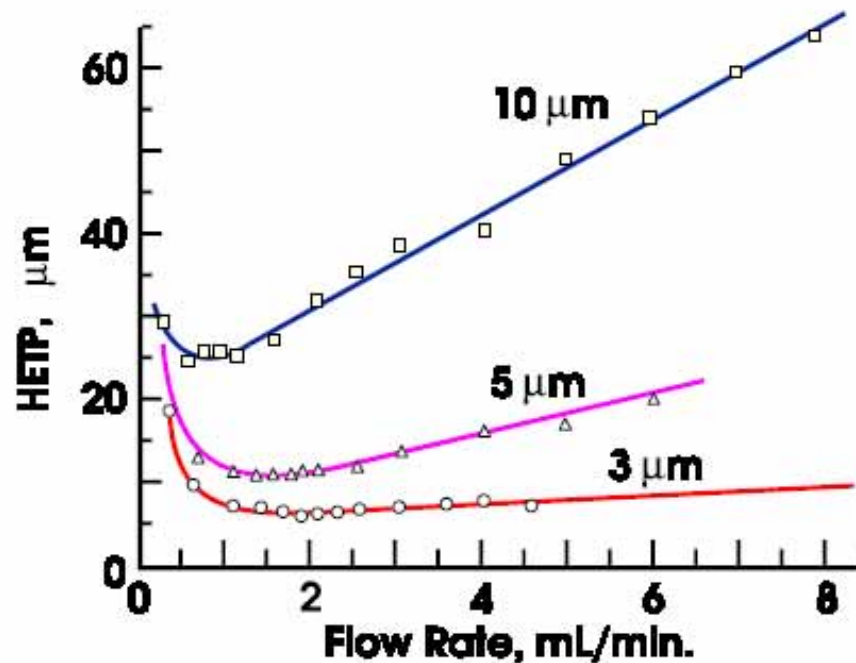
# Increased Efficiency

- In any method the object is to increase mobile phase / stationary phase interaction.
- Decrease particle size.
  - Better packing – slower flow.

## Curva di Van Deemter

Effetto di  $d_p$  e del flusso ( $F$ ) sull'efficienza (HETP)

- ❖ Piccole  $d_p$  danno HETP più bassi
- ❖ Il flusso ottimale è maggiore con  $d_p$  più piccole
- ❖ Colonne con particelle piccole hanno minor perdita di efficienza a flussi alti





## *HPLC: caratteristiche*

- ❖ Fase stazionaria costituita da particelle molto piccole 3 - 10  $\mu\text{m}$
- ❖ Colonne di piccolo diametro 2 - 5 mm
- ❖ Pressioni di ingresso elevate
- ❖ Precisione nell'introduzione del campione
- ❖ Portata della fase mobile controllata
- ❖ Rivelatori in linea



**Elevata risoluzione**  
**Analisi rapide**

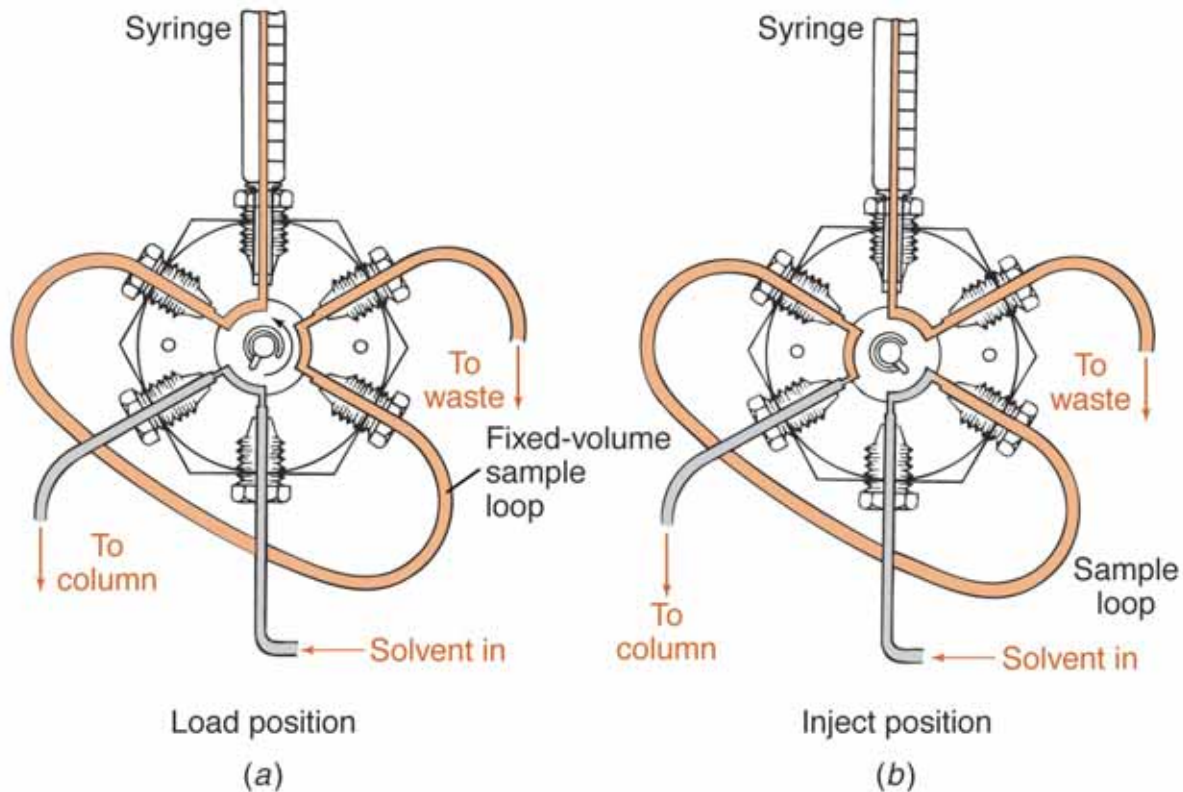
# HPLC Vantaggi



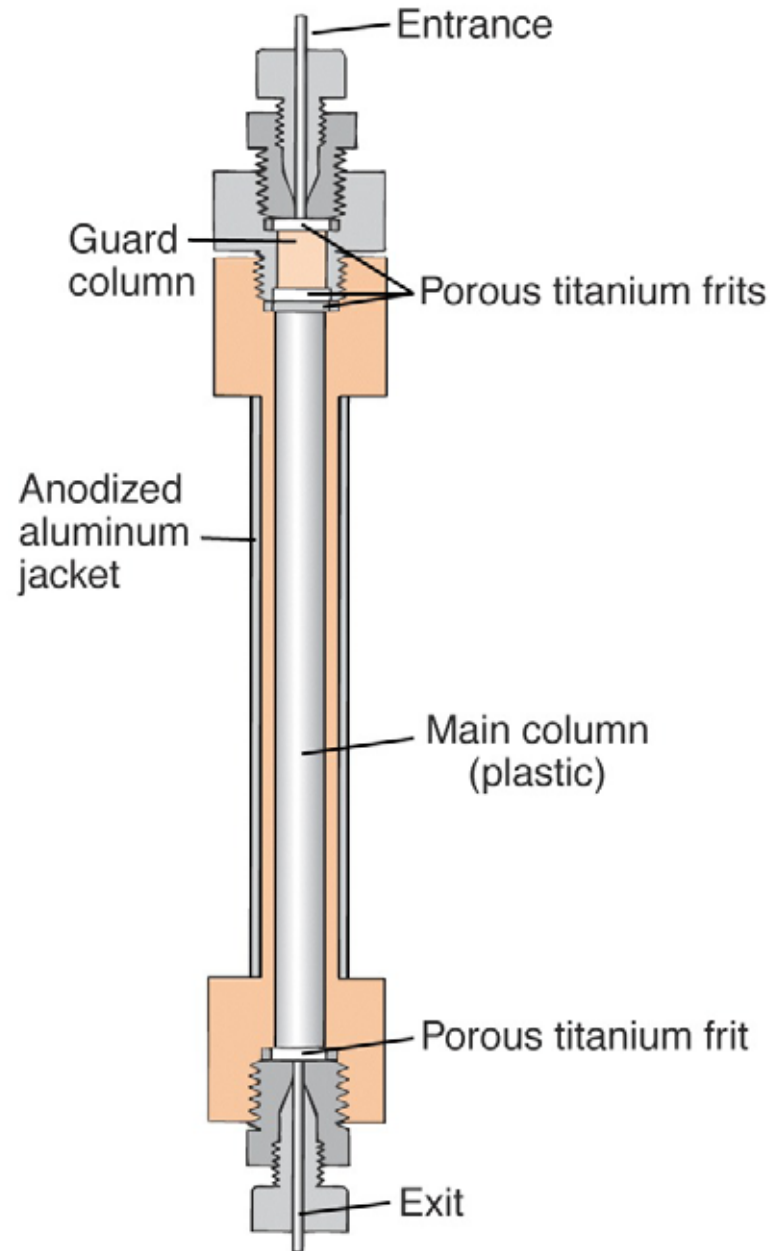
- ❖ **Rapidità e precisione in analisi quantitative**
  - Tipico tempo di analisi di 5 - 20 min.
  - Precisione RSD < 0.5 - 1%
- ❖ **Analisi automatizzate**
  - Usando autocampionatori ed elaboratori di dati
- ❖ **Alta sensibilità**
  - Limite di rivelabilità (LOD) di ng a pg
- ❖ **Recupero del campione quantitativo**
  - Tecniche preparative da  $\mu\text{g}$  a g
- ❖ **Adatta a diversi tipi di campioni**
  - Può analizzare > 60% di tutti i composti vs. 15% della GC

# Injection

- Sample loop filling either done manually or by and autoinjector



# HPLC Columns



# CROMATOGRAFIA DI RIPARTIZIONE/ADSORBIMENTO

## FASE STAZIONARIA

In **cromatografia** liquida di **adsorbimento**, la **fase stazionaria** è un **solido poroso**.

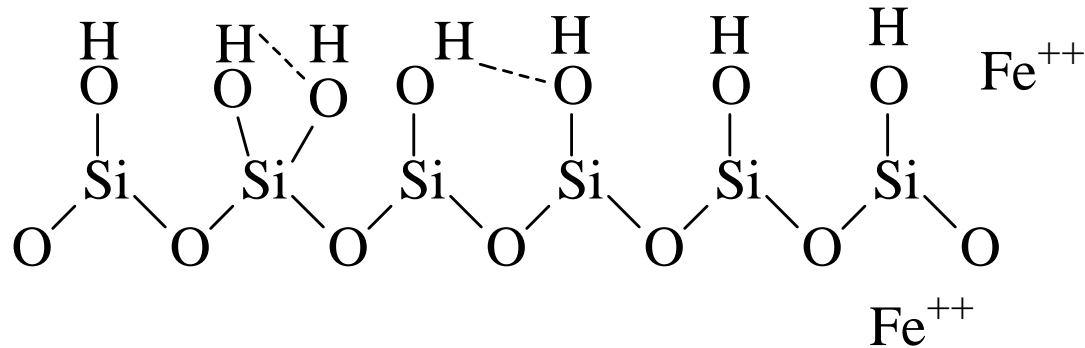
In **cromatografia** liquida di **partizione** si utilizza una **fase stazionaria liquida**, che riveste la superficie delle particelle di supporto.

La fase stazionaria liquida è oggi costituita da una **fase stabile chimicamente legata** alla supporto, detta **bonded phase (BP)**.

Il **supporto** (o matrice) è generalmente costituito da **silice**: i gruppi OH della silice (**silanoli**) vengono utilizzati per **legare chimicamente la fase stazionaria**.

Le fasi legate possono essere **polari** (ad es. con un ammino gruppo o un ciano gruppo), utilizzate in **fase normale**; oppure **apolari** (ad es. con una catena alchilica, come quella octadecilica, C18), usate in **fase inversa**.

# FASE STAZIONARIA: CHIMICA DELLA SILICE



La superficie della silice presenta **gruppi silanolic** (Si-OH), i gruppi reattivi utilizzati per **legare la fase stazionaria** al supporto.

La composizione in silanoli non è costante e regolare su tutta la superficie della silice.

Nella **silice di tipo A** (di origine naturale) la presenza di metalli come impurezze causa ulteriore **variabilità nella reattività** dei silanoli. La **silice di tipo B** (di origine sintetica) ha una composizione **più controllata**.

# CROMATOGRAFIA DI RIPARTIZIONE/ADSORBIMENTO

## FASE STAZIONARIA

In cromatografia liquida di adsorbimento, la fase stazionaria è un solido poroso.

In cromatografia liquida di partizione si utilizza una fase stazionaria liquida, che riveste la superficie delle particelle di supporto.

La fase stazionaria liquida è oggi costituita da una fase stabile chimicamente legata alla supporto, detta **bonded phase (BP)**.

Il supporto (o matrice) è generalmente costituito da silice: i gruppi OH della silice (**silanoli**) vengono utilizzati per legare chimicamente la fase stazionaria.

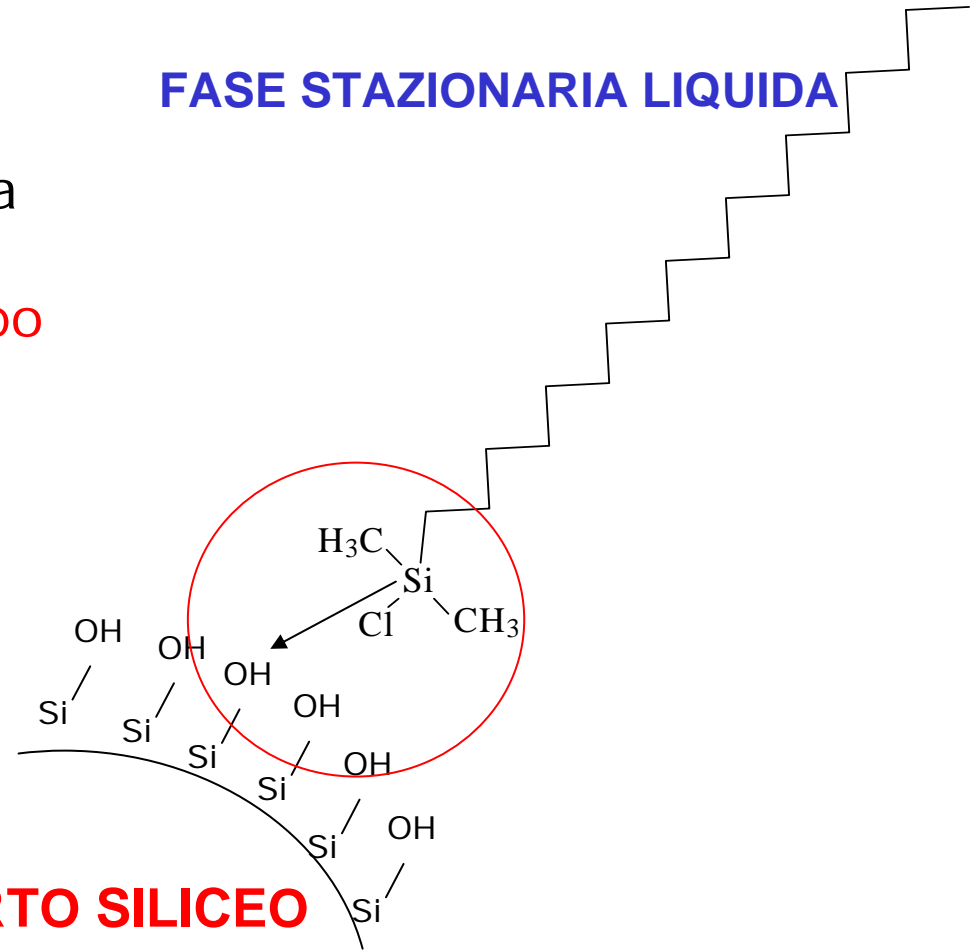
Le fasi legate possono essere polari (ad es. con un ammino gruppo o un ciano gruppo), utilizzate in fase normale; oppure apolari (ad es. con una catena alchilica, come quella octadecilica, C18), usate in fase inversa.

# FASE STAZIONARIA: DERIVATIZZAZIONE DELLA SILICE

La fase stazionaria liquida viene legata ai silanoli della silice per **reazione con un silano contenente un gruppo reattivo** (es. cloro).

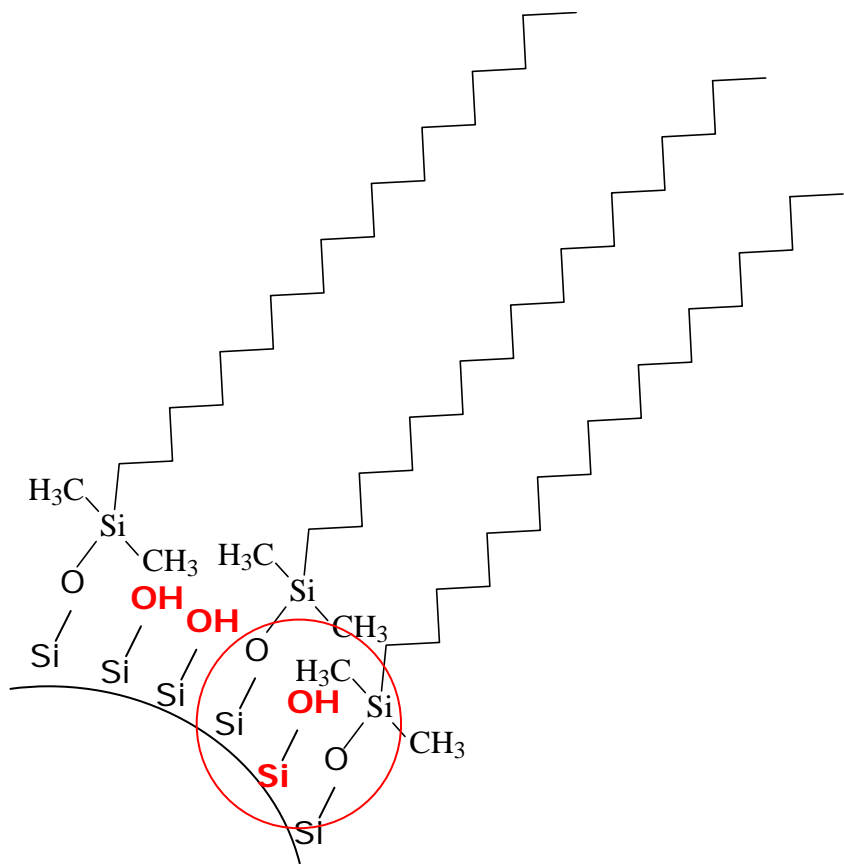
L'atomo di silicio è legato alla molecola della fase desiderata (qui mostrata come C<sub>18</sub> o octadecil) e a due piccoli gruppi laterali come il metile.

## FASE STAZIONARIA LIQUIDA



**SUPPORTO SILICEO**

# FASE STAZIONARIA: DERIVATIZZAZIONE DELLA SILICE

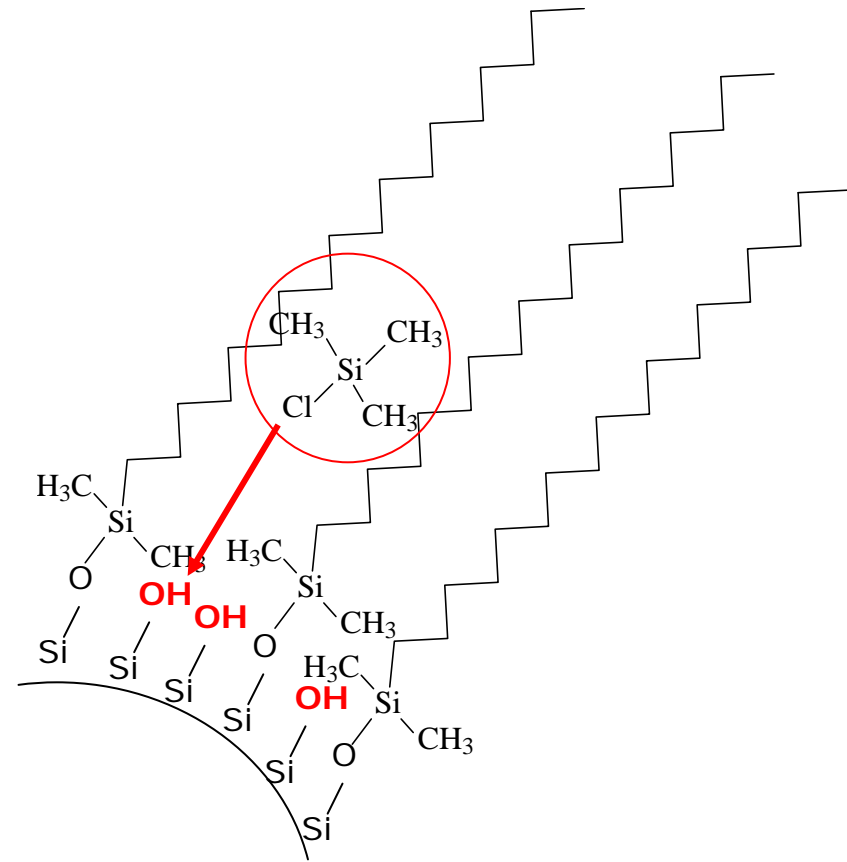


Molti dei silanoli superficiali non reagiscono a causa dell'ingombro sterico. I silanoli che non reagiscono sono spesso chiamati **"silanoli liberi"**. Questo fenomeno è tanto **più rilevante quanto maggiore è l'ingombro del legante**(es. C18).

Il **grado di ricopertura**, espresso in  $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ , è una **misura della densità di fase sulla superficie della particella**.

# DISATTIVAZIONE DELLA SILICE (ENDCAPPING)

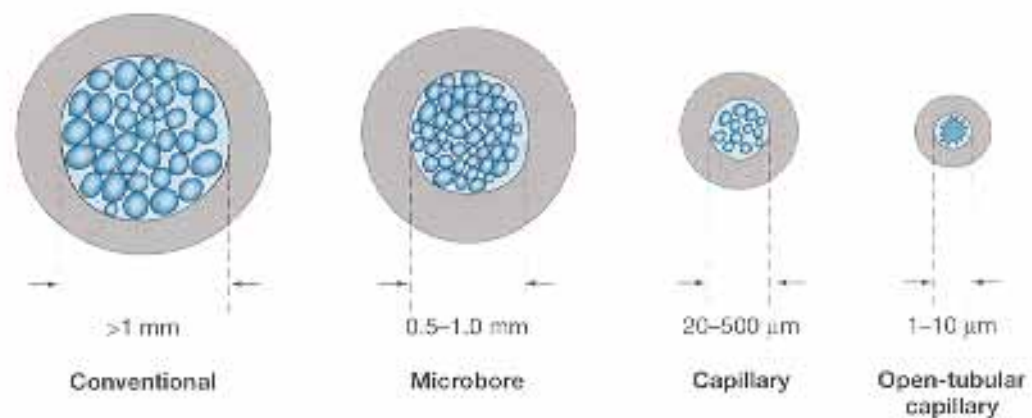
I silanoli liberi sono disponibili per altre interazioni con le molecole di soluto, spesso indesiderate (sono causa dei picchi scodati). Viene quindi spesso effettuato un processo di **“end-capping”** utilizzando un silano di piccole dimensioni che si lega ai silanoli liberi. Piccoli silani come il trimetilclorosilano sono in grado di accedere a molti dei silanoli liberi rimasti dopo il legame della fase stazionaria. Il processo di **end-capping** rende i silanoli inaccessibili alle molecole di soluto.



# FASE MOBILE IN CROMATOGRAFIA LIQUIDA

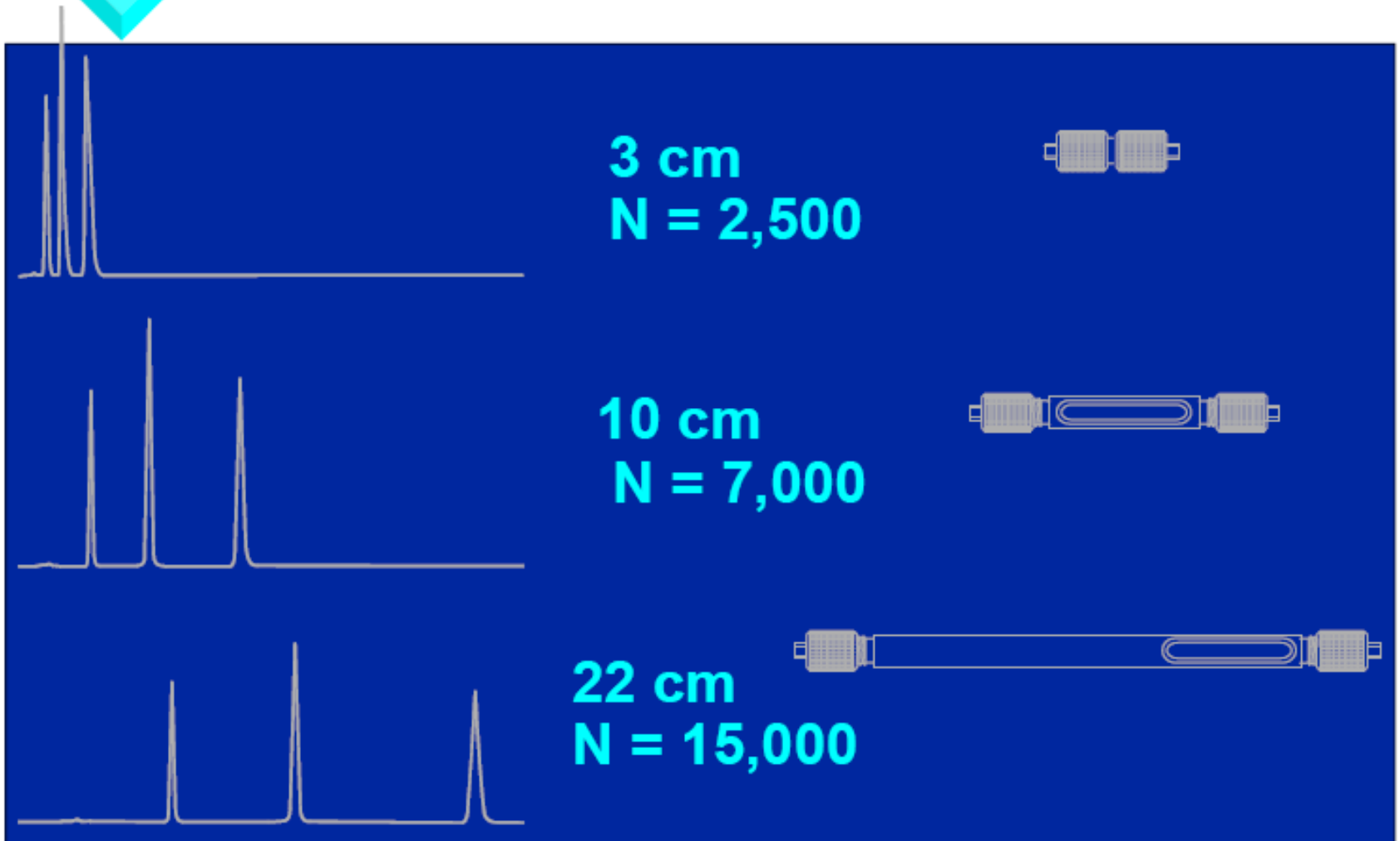
In tutti i tipi di cromatografia liquida, **tranne** quella di **esclusione dimensionale**, la **fase mobile** gioca un ruolo **fondamentale nella separazione**. E' possibile utilizzare un **solvente singolo**, tuttavia molto spesso è necessario utilizzare una **miscela di due o più solventi** per ottenere la fase mobile di composizione ottimale.

Durante l'analisi è possibile effettuare un'**eluizione isocratica** (mantenendo **costante la composizione della fase mobile**) o un'**eluizione in gradiente** (**la composizione della fase mobile varia** durante l'analisi). L'eluizione in **gradiente** viene utilizzata **quando** la miscela di analiti comprende **composti di caratteristiche molto diverse tra loro** e serve per migliorare la separazione e ridurre i tempi di analisi.

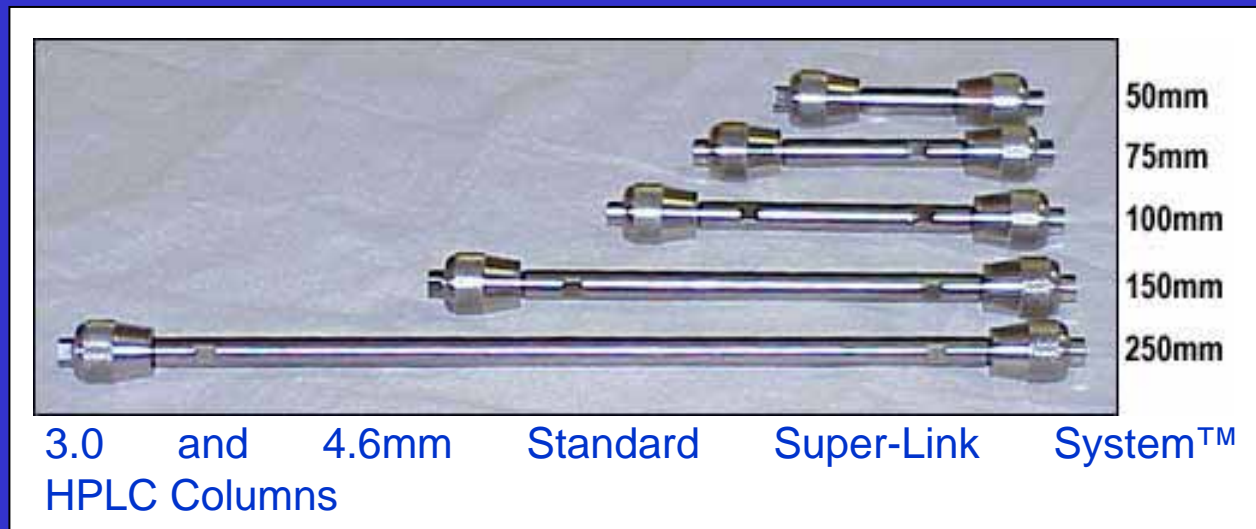


**FIGURE 3.17.** Columns of different diameters. The images represent cross-sections through packed columns.

# *Effetto della lunghezza della colonna*



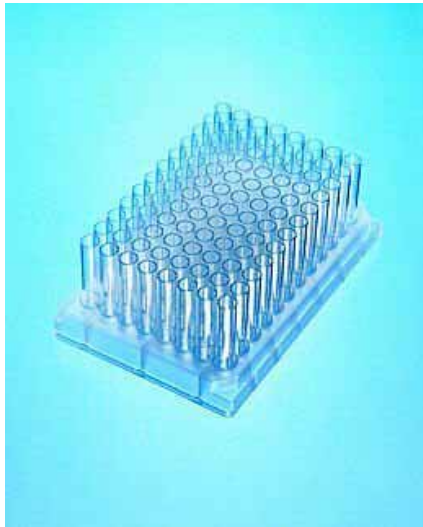
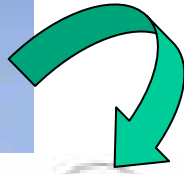
## Colonne (precolonne\*, colonne analitiche, le più diverse)

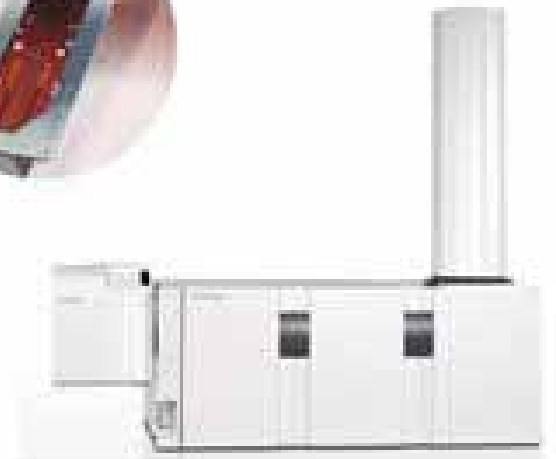


**Rivelatori** (Il rivelatore può essere **selettivo** verso una classe di analiti (es: solo i composti che assorbono nell'UV, solo quelli fluorescenti, ecc) o **universale** (rivela *tutti* i componenti). In cromatografia liquida i rivelatori più usati sono:

- rivelatore UV-vis
- rivelatore a fluorescenza
- rivelatore a indice di rifrazione (RI)

\* Per rimuovere particolato, saturare la fase mobile con la stazionaria



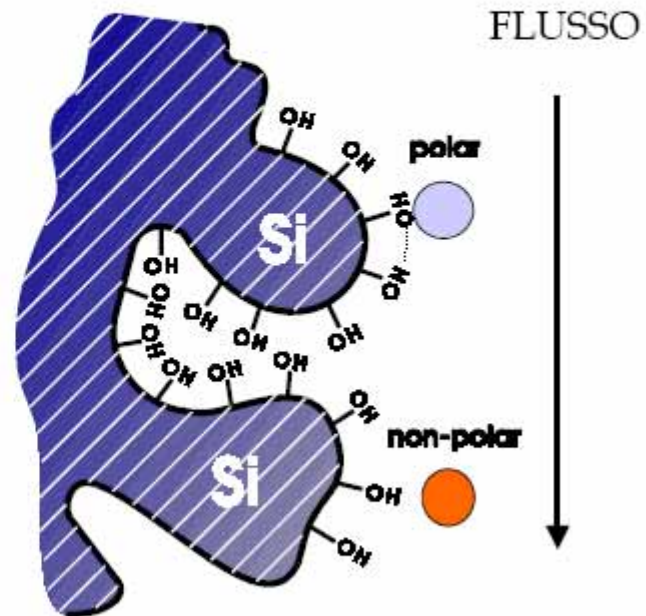


# Bonded Phases

- $\text{SiOH} + \text{ClSi}(\text{CH}_3)_2 - \text{R} = \text{Si-O}(\text{CH}_3)_2 - \text{R}$
- Change surface polarity
  - Amino  $(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$
  - Cyano  $(\text{CH}_2)_3\text{C}\equiv\text{N}$
  - Diol  $(\text{CH}_2)_2\text{OCH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OH}$
  - Octadecyl  $(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3$
  - Octyl  $(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$
  - Phenyl  $(\text{CH}_2)_3\text{C}_6\text{H}_5$

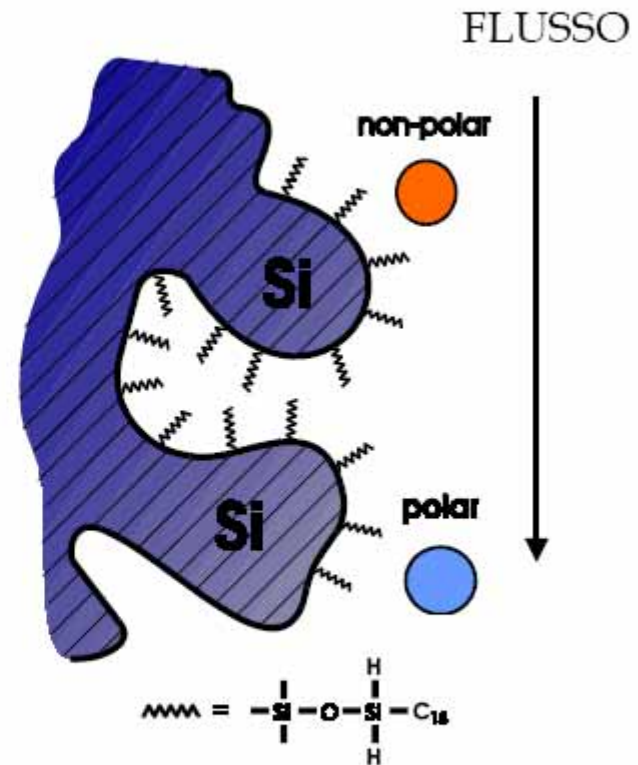
## Cromatografia liquido-solido (LSC) o in fase normale

- ❖ Usa silica, alumina, fasi legate amino-, ciano-, o fenil
  - Usa fasi mobili non polari come esano,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  modificato con isopropanolo
  - Analiti polari hanno tempi di ritenzione più lunghi
- ❖ Eccellente per analiti non polari, isomeri, separazione in gruppi omogenei in polarità



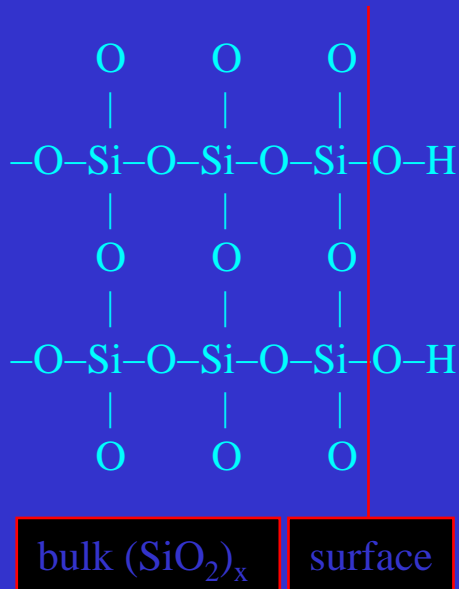
# Cromatografia in fase inversa (RPC)

- ❖ Separazione basata sulla ripartizione dell'analita in una fase stazionaria idrofobica legata a gel di silice (es., C18, C8)
  - Usa fasi mobili polari come miscele di metanolo/acetonitrile e acqua; analiti polari eluiscono prima mentre i non polari sono più ritenuti
- ❖ Modo HPLC più comune, usato in > 60% di tutte le separazioni LC
  - Per analiti polari (solubili in acqua), di media polarità, e talvolta non-polari
  - Analiti ionici possono essere separati usando reagenti di coppia ionica



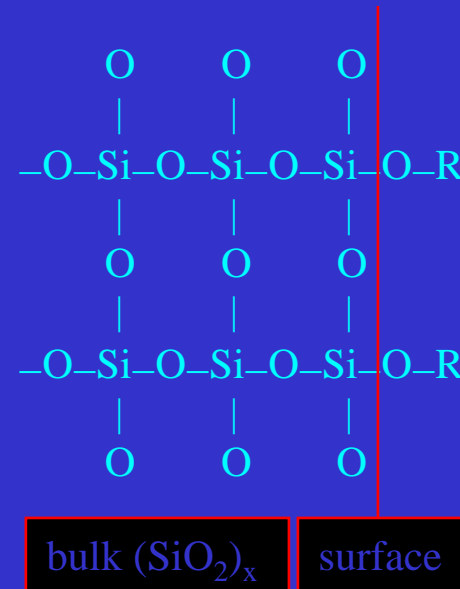
# Chromatography Stationary Phases

Silica Gel



relatively *polar* surface  
“normal phase”

Derivatized Silica Gel



relatively *nonpolar* surface  
“reversed phase”

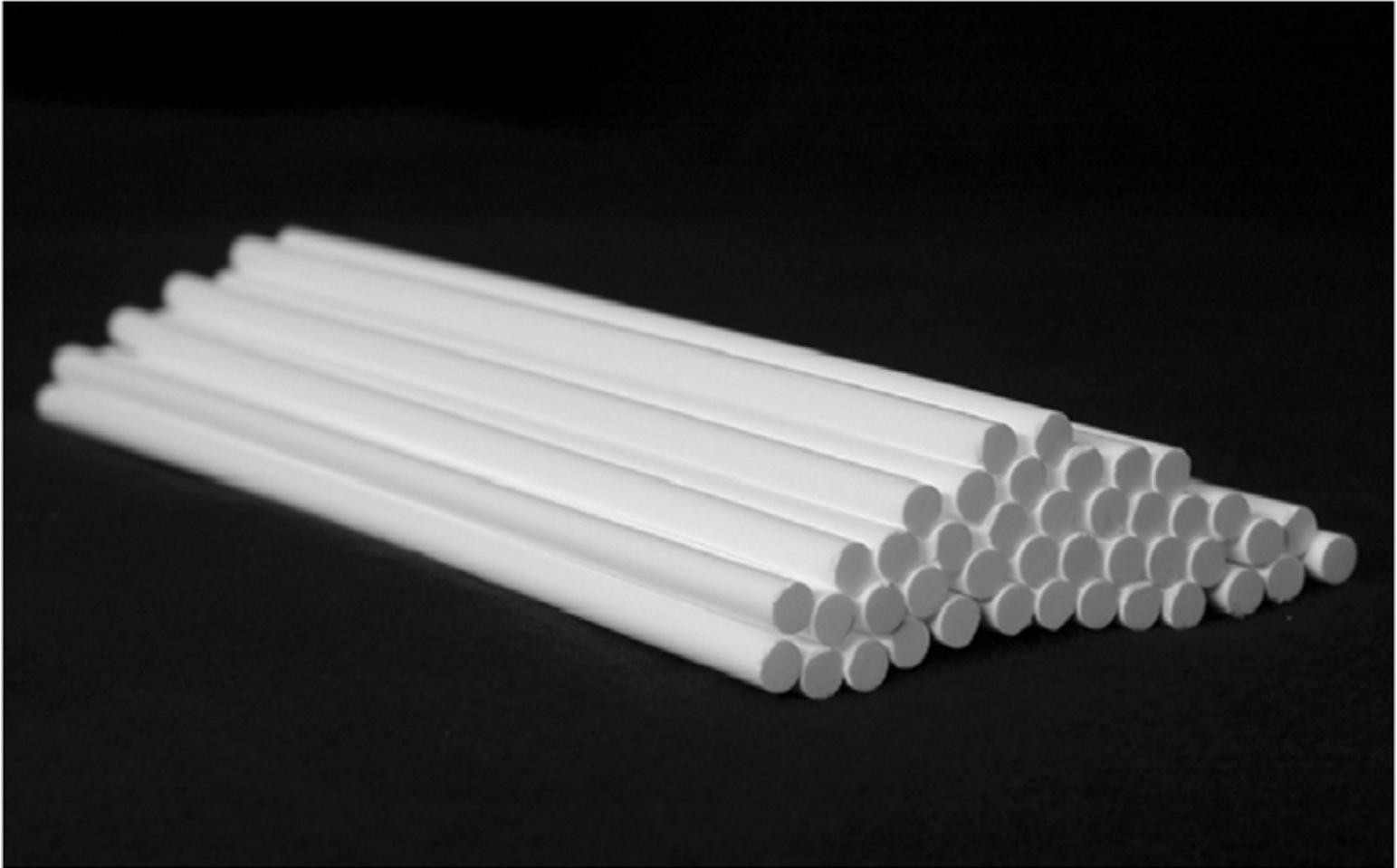
Where R =  $\text{C}_{18}\text{H}_{37}$   
hydrocarbon chain  
(octadecylsilyl deriv.  
silica or “C18”)

# Smaller is Better

- $N \sim 3500 L (\text{cm}) / d_p (\mu\text{m})$
- Smaller particle size leads to
  - Higher plate number
  - Higher pressure
  - Shorter optimum run time

# New Technology

Monolithic Silica Columns



# SCelta DELLA FASE MOBILE

La scelta dei solventi da utilizzare per la fase mobile dipende dal tipo di cromatografia:

- nella cromatografia di adsorbimento/ripartizione la polarità dei solventi è il parametro più importante;
- nella cromatografia a scambio ionico sono importanti il pH e la forza ionica;
- nella cromatografia ad esclusione dimensionale deve essere considerata la solubilità degli analiti nella fase mobile ed il suo effetto sulle dimensioni e l'arrangiamento sterico delle molecole degli analiti.

# SCelta DELLA FASE MOBILE

Non tutti i solventi possono essere utilizzati in HPLC.

Devono infatti possedere queste **caratteristiche**:

- devono essere **miscelabili** in diverse proporzioni
- **non devono interagire chimicamente** con gli analiti o gli altri solventi
- **non devono alterare la risposta del rivelatore** (ad es. assorbire significativamente all'UV)
- devono avere una **bassa viscosità**
- devono essere **poco tossici** e **poco infiammabili**
- devono essere **non troppo costosi**

**La fase mobile più comune in HPLC a fase inversa (RP-HPLC) è costituita da acqua miscelata con metanolo, acetonitrile, oppure tetraidrofurano (THF).**

# Elution

- Competition for the surface.
- Which substance has the greater surface affinity – a solvent with a higher affinity will push the analytes along.

# The Eluotropic Series

**Table 25-2** Eluotropic series and ultraviolet cutoff wavelengths of solvents for adsorption chromatography on silica

Solvent	Eluent strength ( $\epsilon^\circ$ )	Ultraviolet cutoff (nm)
Pentane	0.00	190
Hexane	0.01	195
Heptane	0.01	200
Trichlorotrifluoroethane	0.02	231
Toluene	0.22	284
Chloroform	0.26	245
Dichloromethane	0.30	233
Diethyl ether	0.43	215
Ethyl acetate	0.48	256
Methyl <i>t</i> -butyl ether	0.48	210
Dioxane	0.51	215
Acetonitrile	0.52	190
Acetone	0.53	330
Tetrahydrofuran	0.53	212
2-Propanol	0.60	205
Methanol	0.70	205

The ultraviolet cutoff for water is 190 nm.

SOURCES: L. R. Snyder, in *High-Performance Liquid Chromatography* (C. Horváth, ed.), Vol. 3 (New York: Academic Press, 1983); *Burdick & Jackson Solvent Guide*, 3rd ed. (Muskegon, MI: Burdick & Jackson Laboratories, 1990).

# LA COLONNA CROMATOGRAFICA

Le **dimensioni della colonna** vengono scelte in modo da raggiungere il miglior compromesso in funzione di: **capacità di carico, consumo di solventi, risoluzione desiderata e velocità dell'analisi.**

Le tipiche **colonne cromatografiche analitiche** sono lunghe **15-25 cm**, hanno **diametro interno di 2-5 mm** e sono riempite con materiali a **granulometria di 5-10  $\mu\text{m}$ .**

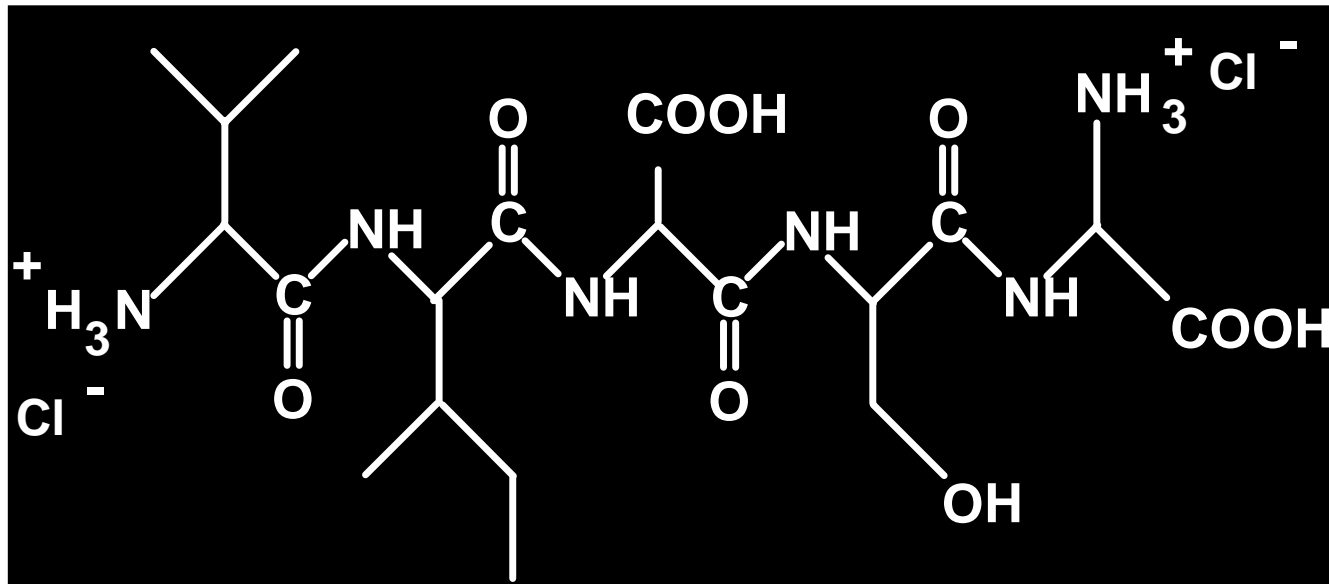
Le **colonne più moderne** (per cromatografia ad alta velocità) sono lunghe **3-5 cm** e sono riempite con materiali di **3-5  $\mu\text{m}$ .**

Sono inoltre disponibili colonne **microbore** di lunghezza **25 cm**, **diametro interno di 1 mm** e materiali di **10  $\mu\text{m}$ .**

Le **colonne cromatografiche preparative** sono **lunghe almeno 25 cm** ed hanno **diametro interno di almeno 7.**

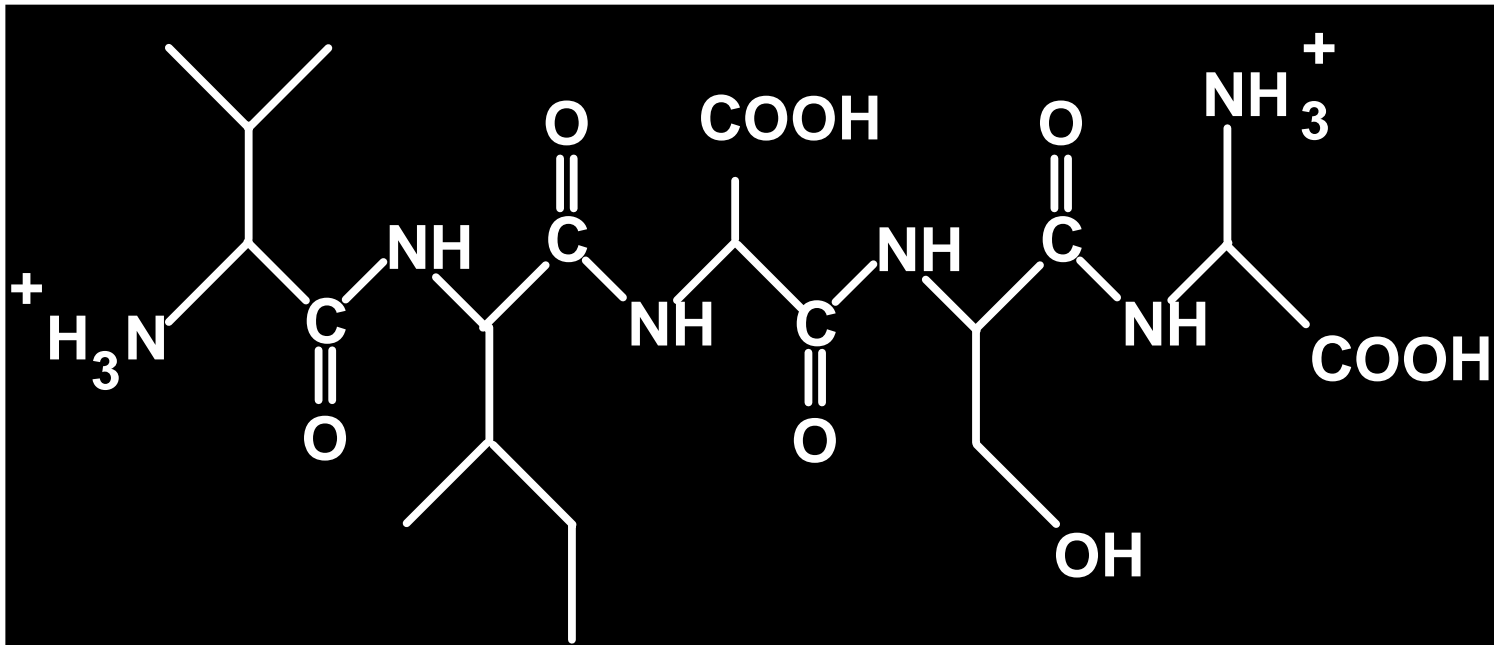
# Structure of Peptides in Solution

## Ion Suppression with HCl



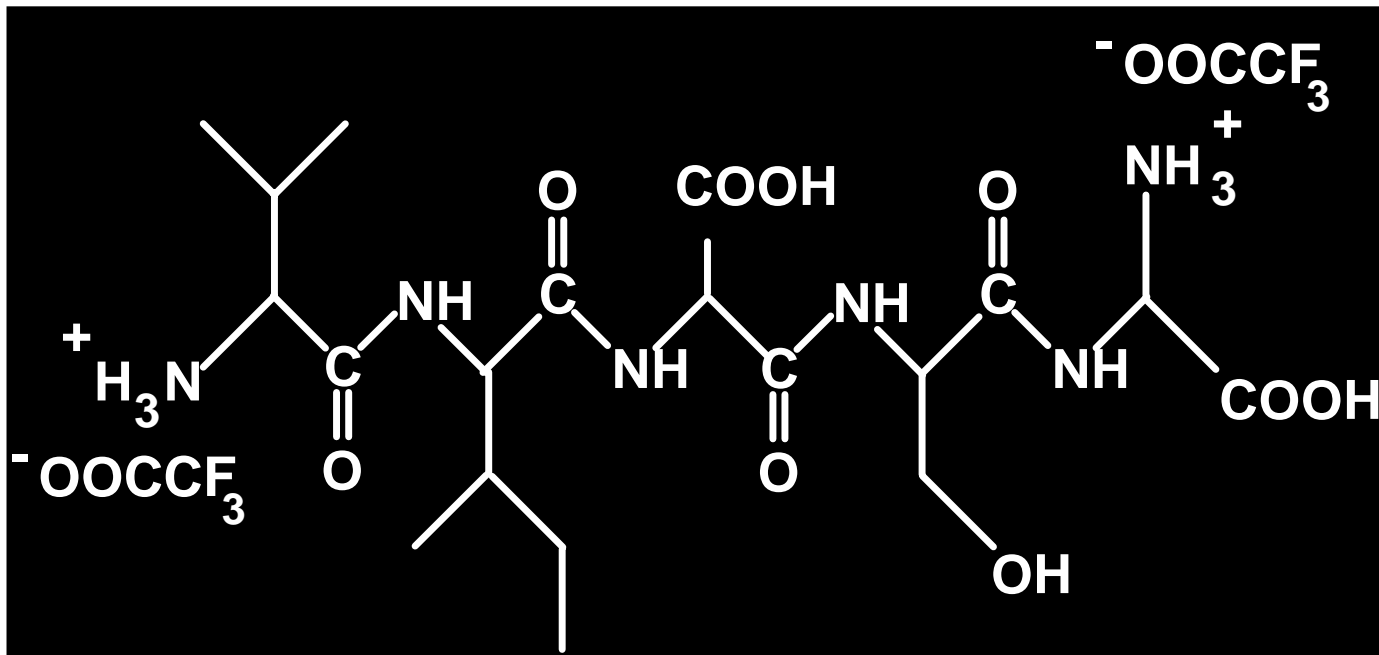
# Structure of Peptides in Solution

Ion Suppression (acid pH)



# Structure of Peptides in Solution

## Ion Suppression with Ion Pairing



## ION SUPPRESSION



Molecola con gruppo carbonilico carico

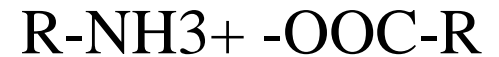


Molecola polare non carica

## ION PAIRING



Acido organico aggiunto all'eluente



Coppia ionica

# Use of Polar (Acid) Modifiers in Peptide Separations

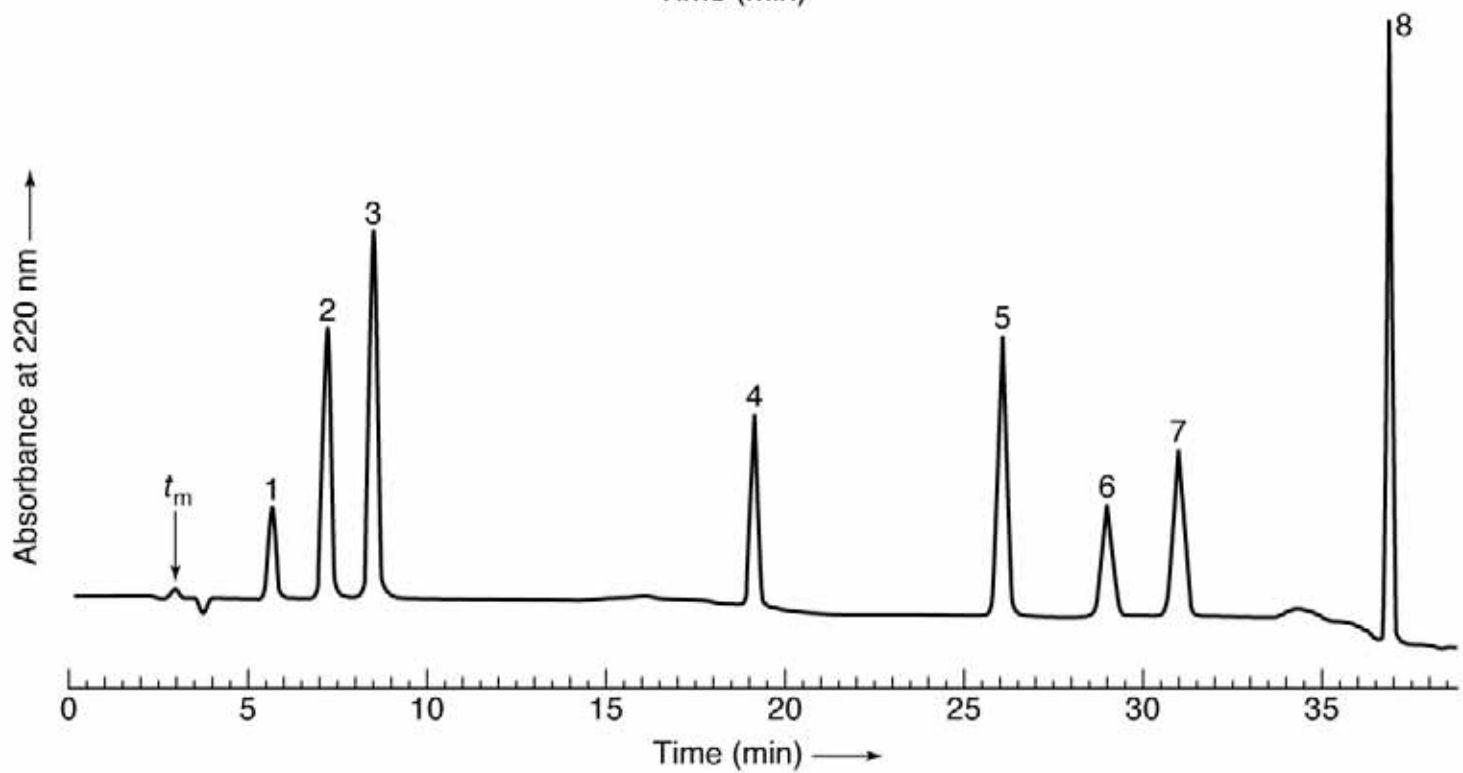
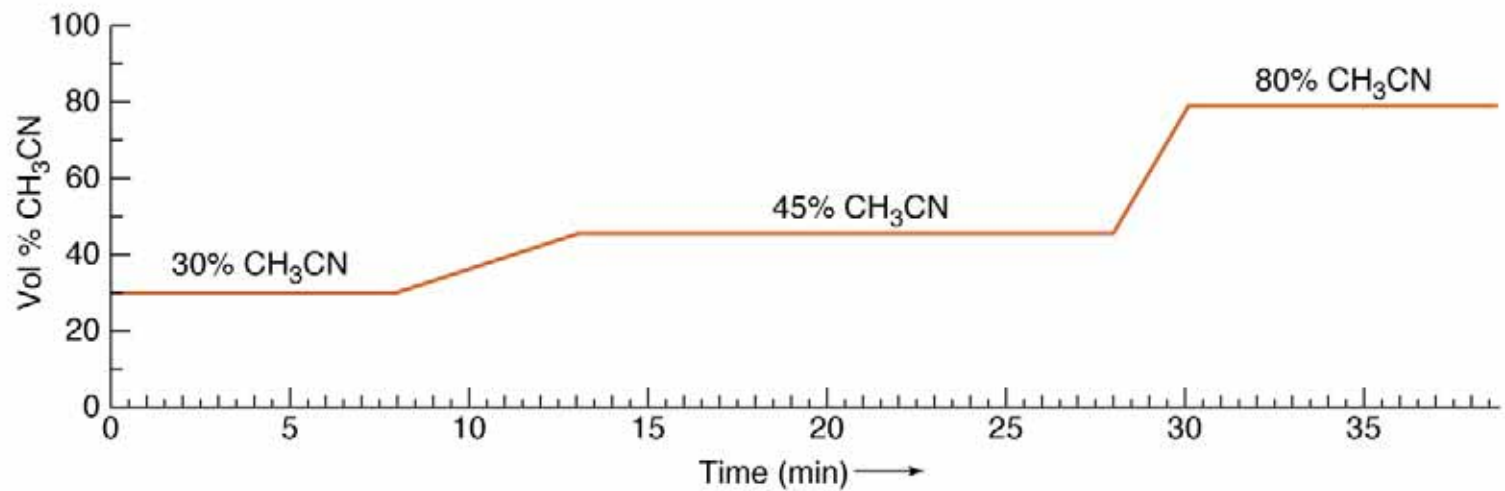
- Aids in peptide solvation
- Suppresses ionization
- Provides ion pairing
- Preferably volatile for sample preparation and LC/MS

# Why use Trifluoroacetic Acid (TFA)?

- Good detection sensitivity
- Good efficiency
- Good recovery
- Volatile mobile phase

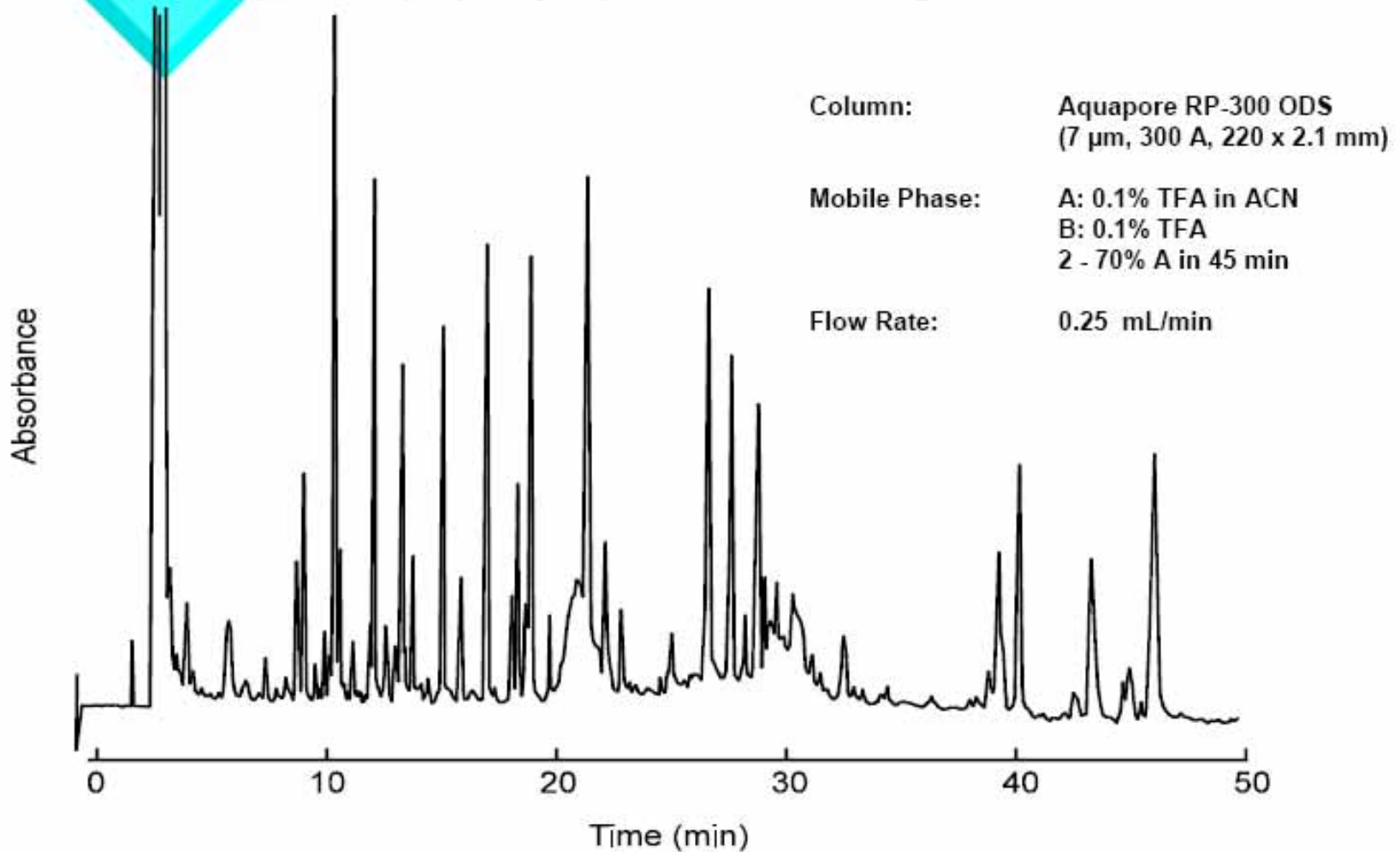
# Isocratic and Gradient Elution

- Isocratic - same composition
- Gradient - composition changes over time
  
- Method Development.
- A mixture of compounds. Separated with acetonitrile (B) and aqueous buffer (A)
- 1) benzyl alcohol 2) phenol 3) 3',4'-dimethoxyacetophenone 4) benzoin 5) ethyl benzoate 6) toluene 7) 2,6-dimethoxytoluene 8) o-methoxybiphenyl



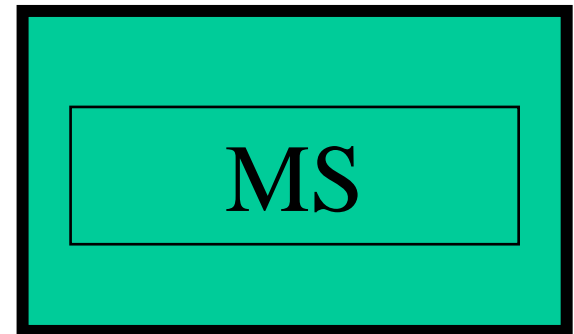
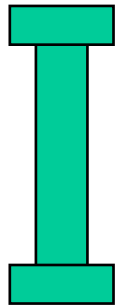
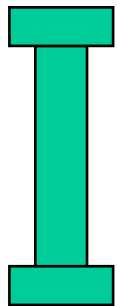
# Separazione di una miscela di peptidi

## Tryptic Map of Glycoprotein Human IgA



# MULTI-DIMENSIONAL SEPARATIONS: AN ALTERNATIVE TO 2-D PAGE

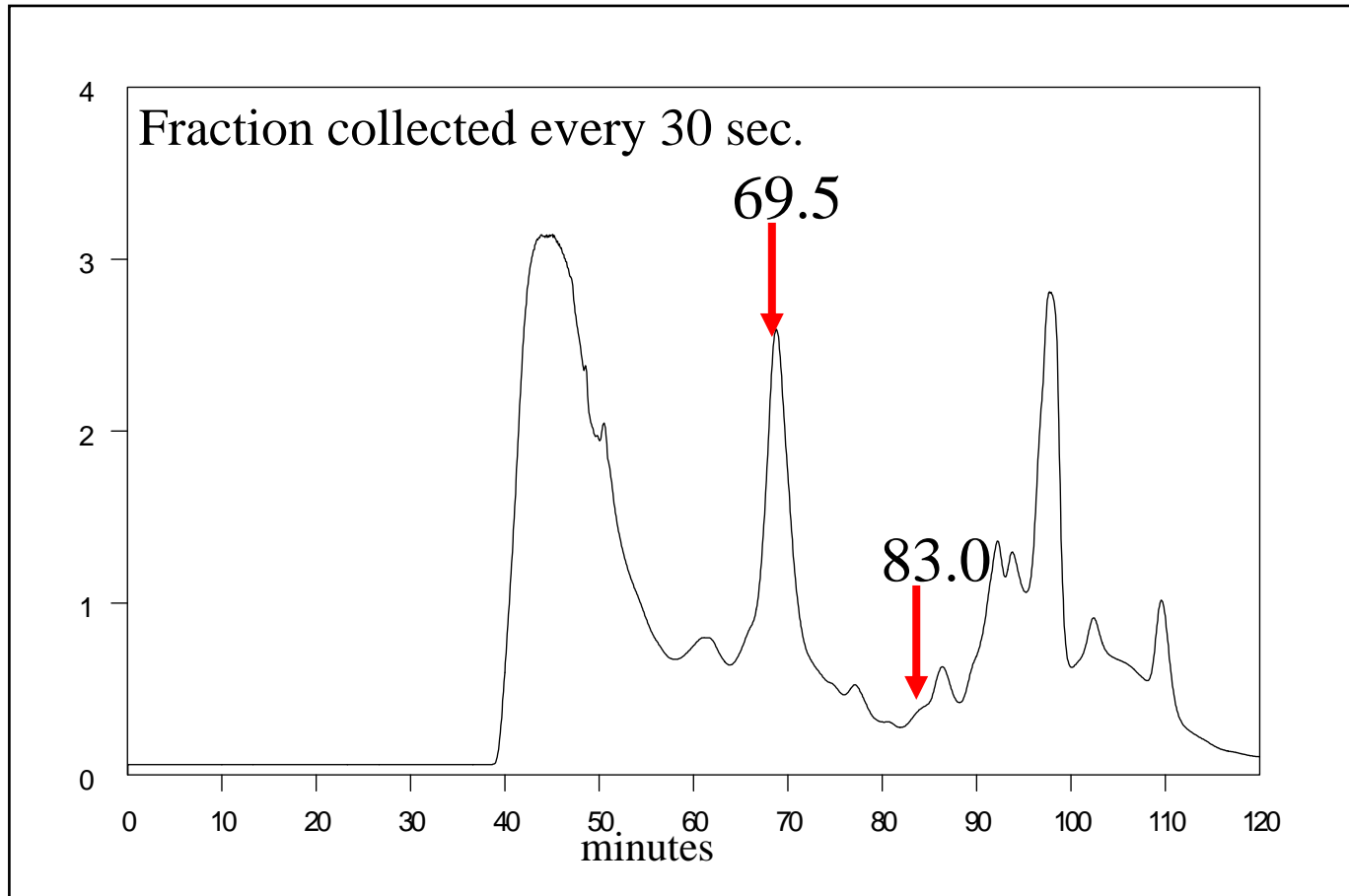
In multidimensional chromatography two (or more) techniques with “orthogonal” properties are combined to achieve higher separation power.



FIRST  
DIMENSION:  
e.g. Size Exclusion,  
Ion-Exchange

SECOND DIMENSION:  
e.g. Reversed Phase  
Ion-Exchange

# FIRST DIMENSION: SIZE-EXCLUSION CHROMATOGRAPHY

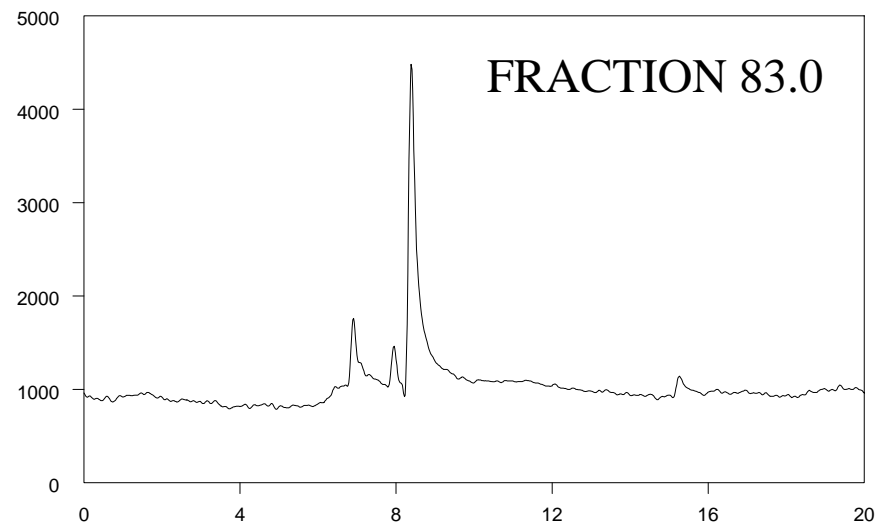
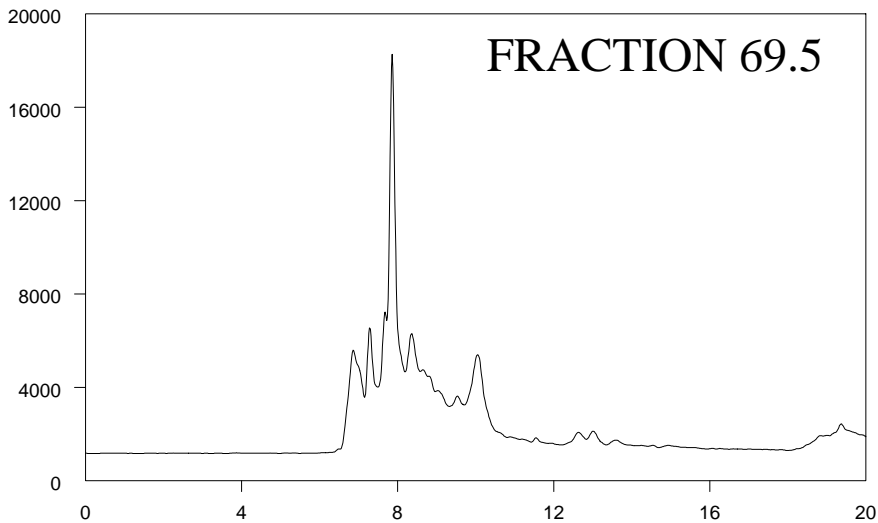


SAMPLE: *E. coli* total protein extract

COLUMN: TSK 3000 SWxl (two))

MOBILE PHASE: Am. Acetate 200 mM (water/ACN 87:13). 0.25 ml/min

# SECOND DIMENSION: ION-EXCHANGE CHROMATOGRAPHY



minutes

SAMPLE: 30 sec. fractions collected after SEC

COLUMN: weak anion exchange  
TSK-DEAE, NPR 4.6 x 50 mm

MOBILE PHASE A: Amm. Ac. 0.025 M

MOBILE PHASE B: Amm. Ac. 2 M  
both in water/ACN 4:1

GRADIENT:  $t_0=20\%B, t_{10}=20\%B,$   
 $t_{20}=40\%B$