



Università degli Studi di Ferrara

DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE CHIMICHE

CICLO XXII

COORDINATORE Prof. G.GILLI

METODOLOGIE CROMATOGRAFICHE NELLO STUDIO DEI PROCESSI DI ADSORBIMENTO

Settore Scientifico Disciplinare CHIM/01

Dottoranda

Dott.ssa COSTA VALENTINA

Tutore

Dott. CAVAZZINI ALBERTO

Anni 2007/2009

alla mia famiglia

Abstract

Un aspetto importante e in grande sviluppo della moderna cromatografia riguarda la cromatografia preparativa. Lo scopo della cromatografia preparativa è la preparazione di aliquote di materiale ad elevato grado di purezza piuttosto che la separazione e l'identificazione dei componenti di miscele complesse come avviene in cromatografia analitica. In cromatografia preparativa, pertanto, le quantità di materiale iniettate nella colonna cromatografica sono elevate. Quando le quantità iniettate sono confrontabili con la capacità di adsorbimento della zona della colonna occupata dalle molecole in migrazione, le molecole di analita competono per l'adsorbimento sulla superficie della fase stazionaria. Le molecole adsorbite disturbano l'adsorbimento delle altre molecole e questo fenomeno è generalmente descritto da isoterme di adsorbimento di tipo nonlineare. L'isoterma nonlineare nasce dal fatto che le concentrazioni di equilibrio delle molecole di soluto in fase stazionaria e in fase mobile non sono direttamente proporzionali. Isoterme nonlineari si possono determinare in quanto la fase stazionaria ha una capacità finita di adsorbimento ed inoltre tra le molecole nella fase adsorbita possono originarsi interazioni laterali. Lavorando in range di concentrazione dove le isoterme sono nonlineari si entra nel campo della cromatografia nonlineare dove la forma del picco cromatografico è controllata dalla termodinamica del processo. Il tempo di ritenzione, la selettività, il numero dei piatti teorici, l'ampiezza e la forma del picco non sono valori costanti ma dipendono dalle quantità

di analita iniettate e da molti altri fattori.

La misura delle isoterme di adsorbimento, oltre a rappresentare un'informazione fondamentale per comprendere ed ottimizzare una separazione preparativa, è anche lo strumento chiave per lo studio delle interazioni molecole-fasi stazionarie e per la caratterizzazione, in termini di distribuzione delle energie di adsorbimento, dell'eterogeneità dei mezzi adsorbenti. Nel caso in cui sulla fase stazionaria siano state ancorate molecole con specifiche caratteristiche (esempio farmaci) o biomolecole (peptidi, proteine, ecc.), la determinazione delle isoterme di adsorbimento consente di studiare e caratterizzare i processi di riconoscimento molecolare tra questi particolari supporti e specifici analiti che vengono iniettati in colonna.

In questo lavoro di tesi si sono affrontati aspetti di studio di base del processo di adsorbimento in diversi tipi di interfaccia liquido-solido e si sono messe a punto tecniche strumentali per la determinazione di isoterme di adsorbimento in svariate condizioni sperimentali. Durante il lavoro, sono stati considerati sistemi con caratteristiche significativamente diverse. In particolare, ci siamo concentrati sulla caratterizzazione di fasi tradizionalmente utilizzate in cromatografia liquida (C18) considerando l'adsorbimento da miscele liquide binarie di composti con diverse caratteristiche chimico-fisiche. Questo tipo di studio è stato esteso su tutto l'intervallo di concentrazioni mediante determinazione di quantità di eccesso attraverso le quali è stato possibile determinare l'adsorbimento preferenziale di un componente rispetto all'altro e caratterizzare il tipo di siti di adsorbimento presenti sulla superficie del mezzo adsorbente. Questi studi sono importanti per comprendere la vera essenza del ruolo dei cosiddetti modificatori organici nel processo separativo cromatografico, ruolo spesso sottostimato o male interpretato. In cromatografia in fase inversa, infatti, il modificatore è ritenuto necessario per aumentare la solubilità degli analiti in fase mobile mentre il suo ruolo attivo nel processo di adsorbimento sulla fase stazionaria è spesso sottostimato.

Si sono poi considerati processi di adsorbimento in sistemi di bioaffinità, in cui cioè si utilizzano fasi stazionarie su cui sono stati chimicamente legate molecole ad attività biologica. Ci siamo interessati allo studio delle interazioni di peptidi e didpetidi su antibiotici

macrociclici (teicoplanina) studiando il processo di binding molecolare. Le caratteristiche del sistema sono tali per cui il processo di adsorbimento dei peptidi o dei polipeptidi sulla teicoplanina è da ritenersi un processo di adsorbimento da soluzioni diluite. In questo caso si è dimostrato che la cromatografia nonlineare può essere considerata una valida alternativa rispetto ad altre tecniche in uso (ELISA, Surface Plasmon Resonance) dal momento che, fornendo la possibilità di interpretare i dati di adsorbimento in tutto l'intervallo di isoterma, consente di distinguere tra contributi selettivi e non-selettivi nel processo di riconoscimento molecolare, cosa che non è realizzabile con altre tecniche di indagine.

In modo analogo sono stati studiati gli equilibri di adsorbimento di una proteina, l'insulina, in diverse condizioni sperimentali per cercare di comprendere i meccanismi responsabili del suo comportamento. Infatti, questo particolare analita, ha dimostrato una grande sensibilità a fronte di cambiamenti anche minimi della composizione del mezzo in cui è sciolto. Per affrontare questo studio, dati nonlineari di isoterma sono stati accoppiati a misure di dicroismo circolare e di spettrometria di massa per cercare di verificare il comportamento della proteina ad alte concentrazioni valutando la possibilità che la struttura terziaria della proteina subisse modifiche conformazionali o che, in particolari condizioni, si venissero a formare agglomerati.

Accanto ai fenomeni di tipo termodinamico, l'altro aspetto fondamentale per la caratterizzazione del processo di adsorbimento riguarda i fenomeni cinetici di trasferimento di massa, cioè l'insieme di tutti i processi che intervengono nel trasferimento delle molecole di soluto dalla fase mobile alla fase stazionaria. In cromatografia questi possono essere identificati nei processi di dispersione assiale, che comprendono la diffusione molecolare e la cosiddetta diffusione Eddy, gli effetti di trasferimento di massa esterni ed interni ai pori delle particelle (diffusione nel poro e diffusione superficiale), e la cinetica di adsorbimento e desorbimento. In questo lavoro ci siamo occupati dello studio di colonne monolitiche di nuova generazione, ottenute infatti attraverso una polimerizzazione di un monomero di base e un differente legante (cross-linker) tramite irradiazione da raggi gamma. Utilizzando grafici di tipo Van Deemter e plot di tipo cinetico è stato dimostrato che esiste una stretta correlazione tra la lunghezza del cross-linker e l'efficienza della colonna.

Accanto a questi studi di base, durante il lavoro ci siamo occupati dell'utilizzo e dello sviluppo di sistemi cromatografici bidimensionali in due diversi ambiti operativi. In particolare, è stato messo punto un sistema che consente la deconvoluzione e il campionamento online di profili cromatografici misurati in condizioni nonlineari e in gradiente. L'importanza di questo sistema risiede nel fatto che esso consente di ottenere l'informazione necessaria per la determinazione delle isoterme di adsorbimento in modo ottimizzato ed automatizzabile. Infine, un secondo tipo di sistema bidimensionale è stato sviluppato e studiato per un'applicazione pratica: la purificazione e la separazione di un analita in campo farmaceutico. Ponendo in serie due sistemi ortogonali, costituiti da una colonna di tipo "Size Exclusion" e una colonna fenilica, si è sviluppato e validato il metodo per la purificazione e la determinazione di un radiofarmaco, lo Iomeprolo, in campioni di plasma.

1	Introduzione	11
2	Teoria della cromatografia liquida	14
2.1	Cromatografia liquida	14
2.2	Dinamiche del flusso	16
2.3	Efficienza cromatografica	18
2.3.1	Analisi dei momenti	21
2.4	Diffusione e cinetica in cromatografia: il bilancio di massa	23
2.4.1	Velocità e forme del picco	26
2.5	Teoria dell'adsorbimento	27
2.6	Isoterme	29
2.6.1	Isoterme di eccesso e teoria adsorbimento di Gibbs	29
2.6.2	Isoterma Langmuir	32
2.6.3	Isoterma Bi-Langmuir	33
2.6.4	Isoterma Toth	33
2.6.5	Isoterma Langmuir-Freundlich	33
2.6.6	Isoterma Quadratica	34
2.7	Misura delle isoterme	34

2.7.1	Analisi frontale	34
2.7.2	Perturbazioni	35
2.7.3	Metodi inversi	36
3	Casi studiati	37
3.1	Caratterizzazione dell'eterogeneità del processo di adsorbimento	37
3.1.1	Caratterizzazione della fase stazionaria C18	38
3.1.2	Misura isoterme di eccesso	39
3.1.3	Discussione Risultati	40
3.2	Bi-dimensionale in gradiente	44
3.2.1	Teoria del Gradiente	46
3.2.2	Misure effettuate	48
3.3	Determinazione di costanti di binding in sistemi di bioaffinità	56
3.3.1	Determinazione del binding	57
3.3.2	Caratteristiche colonna Teicoplanina	59
3.3.3	Interpretazione dei dati	60
3.4	Studio degli equilibri di adsorbimento dell'insulina in fase inversa	64
3.4.1	Insulina: forma e caratteristiche	65
3.4.2	Scelta delle condizioni sperimentali	66
3.4.3	Ritenzione dell'Insulina	67
3.4.4	Caratterizzazione della colonna	69
3.4.5	Analisi Frontale dell'Insulina	70
3.4.6	Paragone tra differenti colonne	76
3.4.7	Risultati ottenuti	78
3.5	Cinetica di trasferimento di massa in supporti monolitici	81
3.5.1	Determinazione dell'efficienza cromatografica	82
3.5.2	Paragone tra le colonne monolitiche e impaccate tramite efficienza cromatografica	83
3.5.3	Paragone colonne monolitiche e impaccate tramite metodi cinetici	85

3.6	Sviluppo di un metodo analitico per la determinazione quantitativa dello Iomeprolo nel plasma umano.	88
3.6.1	Scelta del metodo analitico	89
3.6.2	Column Switching Mode	90
3.6.3	Validazione del metodo	92
3.6.4	Campioni studiati	95
	Bibliografia	97
	Articoli allegati	111

CAPITOLO 1

Introduzione

Il processo cromatografico consiste nella separazione degli analiti di un campione che viene fatto percolare attraverso una fase impaccante con un opportuno solvente. Per ottenere un'ottima separazione cromatografica viene ricercata un'elevata efficienza, un tempo di analisi ragionevole, una pressione di lavoro accettabile e bassi limiti di detezione dei vari composti studiati.

Le proprietà del materiale impaccante e il tipo di colonna cromatografica influenzano i vari fattori che caratterizzano l'equazione dell'altezza del piatto teorico, e quindi l'efficienza. Oltre alle caratteristiche dimensionali della colonna stessa infatti, diversi altri parametri possono influenzare l'efficienza, come la grandezza delle particelle e la loro distribuzione. Al fine di separare miscele sempre più complesse vengono progettate colonne con maggiore potere separativo, che può essere ottenuto da colonne più efficienti, aumentando la lunghezza, diminuendo la grandezza delle particelle del letto impaccante o cambiando il tipo di colonna, passando dalle classiche colonne impaccate a colonne monolitiche. La caratterizzazione delle energie dei vari siti attivi presenti sulla fase stazionaria e la loro distribuzione è fondamentale al fine di determinare i diversi fenomeni all'interfaccia solido-liquido [1]. Con l'utilizzo della teoria di Gibbs e il calcolo dell'eccesso superficia-

le di possono distinguere le diverse interazioni che avvengono all'interno della colonna. Attraverso la misura di isoterme di eccesso è possibile determinare la distribuzione delle energie di adsorbimento e la presenza di diversi tipi di siti attivi sulla fase stazionaria.

Per quanto riguarda la fase mobile si deve considerare la velocità, la viscosità, la densità e soprattutto la composizione dei solventi utilizzati. La miscela di eluenti influisce infatti sui fattori di ritenzione dei componenti da separare. La scelta della composizione viene fatta in modo da ottenere ottima selettività e tempi di ritenzione ragionevoli. In alcuni casi l'utilizzo di un gradiente diventa più conveniente rispetto alla separazione in condizioni isocratiche, aumentando la concentrazione del solvente cosiddetto "forte" infatti i tempi di eluizione tendono a diminuire. Utilizzando le isoterme di adsorbimento si può determinare la ripartizione dell'analita tra la fase mobile e quella stazionaria. Cambiando anche di poco la composizione dei solventi di eluizione la forma dell'isoterma può variare anche in maniera molto evidente.

Il tipo di campione da analizzare assume un ruolo molto importante nel caso si lavori in condizioni isocratiche o di gradiente. Il peso molecolare, la sua capacità di diffondere in fase mobile e la solubilità influenzano la separazione cromatografica. In alcuni casi diventa di fondamentale importanza riuscire a descrivere in maniera completa le diverse interazioni e legami che si possono formare tra l'analita e la fase stazionaria, al fine di spiegare i vari fenomeni di ritenzione che avvengono all'interno della colonna. Tramite l'analisi frontale si possono misurare i vari punti delle isoterme di adsorbimento e dalla forma di queste è possibile ricavare il legame che viene a formarsi tra l'analita e la fase stazionaria.

Tutti questi parametri influenzano la forma finale nei picchi del cromatogramma, e grazie al tipo di picco, al tempo di ritenzione e alla sua ampiezza si può appunto risalire ai parametri principali per il calcolo dell'efficienza e alle varie interazioni che avvengono all'interno della colonna durante il processo cromatografico. Considerando analiti di vario genere (molecole a basso peso molecolare, amminoacidi, proteine, etc.) e fasi stazionarie con diverso tipo di impaccamento (C8, C18, Teicoplanina, colonne monolitiche, etc.) è possibile svolgere studi riguardanti i processi di adsorbimento all'interfaccia solido-liquido,

sia per appurare l'efficienza e i vari fattori che la caratterizzano, che per trattare e approfondire i diversi fenomeni cinetici e termodinamici che influenzano l'adsorbimento di un analita su un supporto cromatografico.

Teoria della cromatografia liquida

2.1 Cromatografia liquida

La cromatografia liquida è un processo di separazione dove una fase mobile percola attraverso un letto poroso chiamato fase stazionaria. Le particelle solide in un mezzo cromatografico hanno diverse funzioni, tra le quali quelle di restringere, deflettere e disperdere il flusso di fase mobile che attraversa lo colonna cromatografica contenente la fase stazionaria [2]. Attraverso questa fase i campioni da analizzare vengono introdotti nel sistema. I vari tipi di interazioni delle molecole del campione tra la fase stazionaria e la fase mobile determinano i processi di trasferimento di massa.

Nelle colonne impaccate la fase adsorbente è costituita da particelle di solido (vedi figura 2.1), e possono essere diversamente derivatizzate con gruppi funzionali. Lavorando in fase normale, in condizioni in cui la fase stazionaria risulta più polare rispetto alla fase mobile, le particelle ad esempio possono essere composte da silice pura. In fase inversa (fase stazionaria meno polare rispetto alla fase mobile) invece vengono spesso utilizzate particelle derivatizzate con catene di carboni a diverse unità (ad es. C_3 , C_5 , C_8

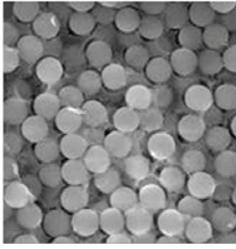


Figura 2.1: Colonna impaccata

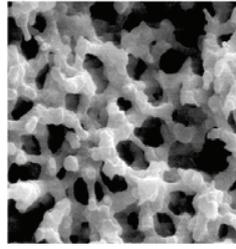


Figura 2.2: Colonna monolitica

e C_{18}) [3]. Un altro tipo di colonne utilizzato in cromatografia liquida sono le cosiddette colonne monolitiche. Queste colonne in genere sono riempite con un polimero sintetizzato direttamente nella colonna, che è presente come un unico blocco (rod), da cui appunto il riferimento al termine monolitico, (vedi figura 2.2). Questo genere di colonne presentano una minor resistenza al flusso delle classiche impaccate, e permettono così di lavorare a velocità di flusso maggiori e ottenere la separazione in minor tempo [4].

La cromatografia liquida può essere suddivisa in due categorie: la cromatografia in condizioni *lineari* e quella in condizioni *non-lineari*. Nel primo caso, chiamato anche a diluizione infinita, la concentrazione dell'analita è molto bassa, le molecole non competono tra di loro per l'adsorbimento sui siti attivi della fase stazionaria. L'isoterma, che descrive l'equilibrio del componente tra la fase stazionaria e quella mobile, ha un andamento di tipo lineare. Il tempo di ritenzione dell'analita risulta indipendente dalla sua composizione e dalla concentrazione, mentre l'altezza del picco risulta direttamente proporzionale alla concentrazione iniettata. Utilizzando una colonna impaccata in maniera omogenea nelle tre direzioni, escludendo fenomeni di tipo extra-colonna, i picchi all'uscita della colonna hanno forma gaussiana. Nel caso di cromatografia non-lineare, l'isoterma di equilibrio ha un andamento di tipo non-lineare, in quanto nel sistema il campione viene introdotto con un'elevata concentrazione e viene a crearsi una competizione tra le molecole per l'adsorbimento sulla fase stazionaria. Questa competizione, nella cromatografia preparativa, determina la formazione di picchi fortemente codati all'uscita della colonna cromatografica. L'isoterma può assumere diverse forme, come ad esempio avere una convessità verso il basso (tipo Langmuiriano) o verso l'alto (tipo anti-Langmuiriano).

Il sistema cromatografico è un sistema dinamico, la fase mobile infatti percola costantemente attraverso il letto di particelle impaccanti che costituiscono la fase stazionaria. Per poter parlare di equilibrio tra la fase mobile e quella stazionaria risulta quindi necessario che i fenomeni di trasferimento di massa (diffusione delle molecole del soluto in fase mobile per raggiungere le particelle del materiale impaccante, la diffusione all'interno dei pori e i processi di adsorbimento-desadsorbimento) siano molto veloci. Se i processi di trasferimento di massa sono infinitamente veloci, si hanno le cosiddette condizioni *ideali*. In questo caso il picco cromatografico e la sua forma dipendono solo dalla termodinamica del processo. Nella realtà queste condizioni non sono soddisfatte dato che è comunque necessario un tempo finito affinché il soluto nella fase mobile venga in contatto con il materiale adsorbente della fase stazionaria. Queste condizioni si dicono *non ideali*. In genere, lavorando con molecole di piccole dimensioni, l'ipotesi di equilibrio istantaneo tra fase mobile e fase stazionaria è soddisfacente, mentre nel caso in cui le molecole analizzate siano di grandi dimensioni, come ad esempio proteine o peptidi, queste condizioni spesso vengono a mancare e gli effetti cinetici non sono più trascurabili [5].

2.2 Dinamiche del flusso

Nel caso ideale, dopo un'iniezione di un impulso rettangolare in colonna, ci si aspetterebbe di misurare all'uscita della colonna un segnale con la stessa intensità e lunghezza. In realtà questo non avviene, si ottiene sempre un allargamento di banda dovuto ad una somma di effetti idrodinamici, e sintetizzati nel termine di dispersione assiale, come schematizzato nella Figura 2.3 [6].

Una diminuzione di concentrazione e di efficienza di separazione può essere dovuta anche dalle dimensioni dei connettori che trasportano il campione dall'iniettore alla colonna e dall'uscita di questa al detector. La lunghezza di questi tubi e il loro diametro vanno minimizzate, tenendo in conto il fatto che questa diminuzione porta sull'aumento della pressione del sistema.

La distribuzione del flusso in colonna è fortemente influenzata dalla contropressione data dall'impaccamento della colonna cromatografica, che porta ad una distribuzione

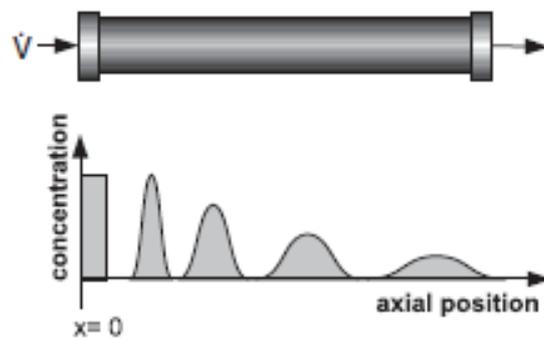


Figura 2.3: Effetto dispersione assiale

radiale del campione. Un impaccamento non ideale può portare ad una perdita di efficienza della colonna, dovuta per esempio all'effetto delle pareti o alla presenza di vuoti tra le particelle della fase stazionaria. Per evitare la formazione di queste vacanze bisogna controllare la pressione di impaccamento della colonna, che se è eccessiva o troppo debole può portare alla formazione di queste cavità, ed aumentarne così la porosità.

La distribuzione non ideale può essere generata da diversi effetti. Effetti microscopici: considerando il passaggio della fase mobile a contatto con le particelle di fase stazionaria, a causa di effetti di adesione del liquido sulle particelle di solido, si ha una velocità di flusso maggiore nel centro del canale rispetto alle pareti, come riportato nella Figura 2.4. Questo porta ad un diverso tempo di ritenzione per le molecole di analita sempre tra il centro del canale (velocità maggiore, tempo di ritenzione minore) e in prossimità delle particelle adsorbenti (velocità minore, tempo di ritenzione maggiore). Effetti mesoscopici : nel caso di particelle di piccole dimensioni di impaccamento si può avere la formazione di agglomerati, che non permettono il passaggio al loro interno della fase mobile e la formazione di percorsi preferenziali del flusso all'interno della fase stazionaria (vedi Figura 2.5). Si hanno così differenze locali della velocità di flusso e della lunghezza del percorso delle molecole di analita all'interno della colonna, che portano ovviamente a diversi tempi di ritenzione. Questo effetto è chiamato "Diffusione Eddy". Le disomogeneità nell'impaccamento e la presenza di vacanze, possono portare ad una distribuzione non ideale del flusso, specialmente in prossimità delle pareti. Anche questi effetti di tipo macroscopico,

schematizzati nella Figura 2.6, comportano una differenza nei tempi di ritenzione [6].

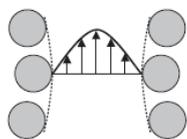


Figura 2.4: Effetti Microscopici

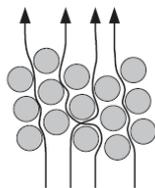


Figura 2.5: Effetti Mesoscopici - Diffusione Eddy

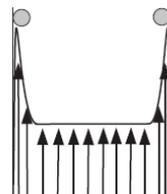


Figura 2.6: Effetti Macroscopici

2.3 Efficienza cromatografica

L'efficienza di una separazione cromatografica è influenzata da diversi fenomeni di adsorbimento sulle particelle porose che compongono le fase stazionaria (vedi schema nella Figura 2.7). Infatti, in aggiunta alla dispersione assiale, diversi altri fenomeni contribuiscono all'allargamento della banda cromatografica. Il primo stadio della separazione è la convezione o diffusione delle molecole del soluto fino alla superficie della particella adsorbente (1). Le molecole devono inoltre attraversare un film superficiale che riveste la particella (2). Un successivo step è il trasporto delle molecole di soluto verso i siti attivi di adsorbimento situati all'interno dei pori. In questa fase avvengono due effetti: la diffusione nei pori (3a) e la diffusione superficiale (3b). L'ultimo step è determinato dalla cinetica di adsorbimento, che entra in atto quando una molecola di soluto raggiunge un sito attivo (4).

Nella maggior parte dei casi la cinetica di adsorbimento è veloce e le equazioni cinetiche di equilibrio sono controllate dalla resistenza al trasferimento di massa. I processi giudicati limitanti tra i vari step sono la diffusione nel film superficiale e il trasporto nei pori [5].

Per caratterizzare in modo quantitativo gli effetti cinetici sulla separazione cromatografica si ricorre alla determinazione dell'*efficienza* cromatografica. La teoria più utilizzata per questa determinazione è quella dell'altezza del piatto teorico, HETP (the height equi-

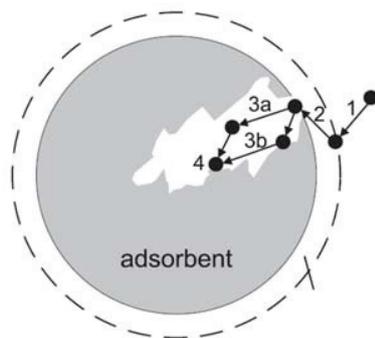


Figura 2.7: Schema particella con film superficiale: fenomeni trasferimento di massa

valent to a theoretical plate), rifacendosi al concetto delle colonne di distillazione, dove in genere questo parametro è espresso come H . L'altezza del piatto teorico è legata alla lunghezza della colonna, L , tramite il numero di piatti nella colonna, N , dalla seguente espressione:

$$H = \frac{L}{N} \quad (2.1)$$

L'altezza del piatto teorico contiene al suo interno i contributi dell'effetto della dispersione assiale, dei processi di trasferimento di massa e delle parti extra-colonna (iniettore, tubing, detector, etc.) che portano all'allargamento della banda cromatografica [7].

Per trovare le migliori condizioni di efficienza per una colonna cromatografica ci sono diverse equazioni che fittano il valore di H contro la velocità lineare u [8]. La più famosa è l'equazione di Van Deemter, che nella sua forma più completa può fornire una descrizione rigorosa per questo termine:

$$H = H_p + H_d + H_m + H_s \quad (2.2)$$

in cui il primo termine, H_p , rappresenta la diffusione Eddy, che assieme alla diffusione molecolare porta ai fenomeni di dispersione assiale all'interno della colonna cromatografica. Il secondo termine, H_d , rappresenta la diffusione longitudinale, il terzo termine, H_m , il trasferimento di massa in fase mobile, mentre l'ultimo termine, H_s , rappresenta il trasferimento di massa in fase stagnante. In genere questa complessa equazione viene scritta nella sua maniera semplificata:

$$H = A + \frac{B}{u} + Cu \quad (2.3)$$

In questa forma il termine A rappresenta la dispersione Eddy, B la diffusione assiale e C gli effetti di trasferimento di massa, e comprende anche la diffusione all'interno delle particelle e la cinetica di adsorbimento e desorbimento. I vari contributi sono schematizzati nella Figura 2.8.

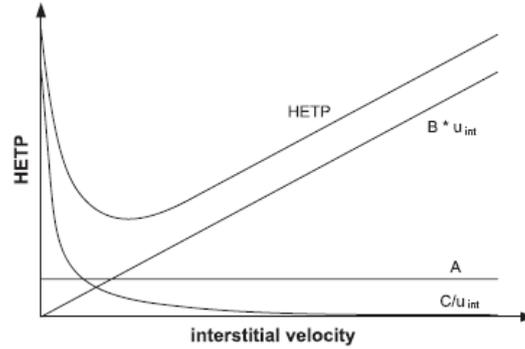


Figura 2.8: Van Deemter: effetto dei vari Parametri

Il valore di H può essere calcolato considerando la somma dei vari componenti. Il parametro A può essere determinato considerando la seguente formula:

$$A = 2\lambda d_p \quad (2.4)$$

dove λ è un parametro che dipende dal tipo di impaccamento e d_p è il diametro delle particelle impaccanti.

B viene calcolato con l'equazione:

$$B = 2\gamma D_m \quad (2.5)$$

Il fattore C riguardante i trasferimenti di massa può essere suddiviso in due parti, considerando i trasferimenti di massa in fase stazionaria, C_S e quelli in fase mobile, C_M . Questi fattori vengono determinati con le seguenti equazioni:

$$C_S = qR(1 - R)\frac{d^2}{D_S} \quad (2.6)$$

$$C_M = \omega_i \frac{d_p^2}{D_m} \quad (2.7)$$

dove q è un fattore dipendente dal tipo di fase mobile, R è la frazione della molecole di campione presente in fase mobile, d lo spessore dello strato di fase mobile attorno alla particella, D_S il coefficiente di diffusione in fase stazionaria e ω_i una costante del sistema. La determinazione puntuale di questi parametri risulta spesso laboriosa e difficoltosa [9].

Esistono altre equazioni di tipo semi-empirico che possono fornire un'indicazione per quanto riguarda l'efficienza. L'equazione di Knox [10], per esempio, considera una dipendenza del termine A dalla velocità di fase mobile ridotta:

$$h = A \cdot v^{1/3} + \frac{B}{v} + C \cdot v \quad (2.8)$$

in cui $h = H/d_p$ e $v = u \cdot d_p/D_m$. Utilizzando i valori ridotti per la velocità e l'altezza di piatto teorico si possono paragonare facilmente colonne con diversa dimensione delle particelle impaccanti.

Un altro modello utile è quello fornito da Giddings, dove è inserito un ulteriore termine, E , che dipende dalla dispersione della fase mobile all'interno degli interstizi delle particelle:

$$H = \frac{A}{1 + (E/u)} + \frac{B}{u} + C \cdot u \quad (2.9)$$

Aggiungendo parametri l'equazione diventa più precisa nel fittare i dati misurati, ma i parametri stessi diventano più difficili da determinare con precisione.

2.3.1 Analisi dei momenti

Considerando una colonna con l'impaccamento uniforme e che gli eluenti siano incomprimibili, il valore di H può essere calcolato dalla seguente espressione:

$$H = \left(\frac{\sigma}{t_R} \right)^2 L_C \quad (2.10)$$

dove σ è la deviazione standard del picco gaussiano misurato in uscita dalla colonna, t_R il tempo di ritenzione dell'analita e L_C la lunghezza della colonna cromatografica. Per la determinazione quantitativa dell'efficienze della colonna si può iniettare una piccola quantità di campione nel sistema cromatografico, e studiare le caratteristiche del picco

misurato al detector. Se il picco è rappresentato da una distribuzione Gaussiana simmetrica, il numero di piatti N risulta legato all'ampiezza del picco, w , dalla seguente formula [11]:

$$N = \left(\frac{t_R}{\sigma}\right)^2 = 16 \left(\frac{t_R}{w}\right)^2 \quad (2.11)$$

Uno dei più importanti metodi per lo studio dei profili cromatografici è il metodo che utilizza i momenti [5]. L'analisi dei momenti fornisce una soluzione analitica al General Rate Model attraverso il dominio di Laplace, infatti il General Rate Model non ha alcuna soluzione analitica, ma la sua trasformata di Laplace ha una soluzione algebrica. Questa soluzione non può essere trasformata nel dominio del tempo (spazio fisico), ma il momento può essere trasformato in questo dominio. Il primo momento assoluto ed il secondo momento centrale forniscono tutte le informazioni dal profilo cromatografico riguardanti la termodinamica di equilibrio tra la fase mobile e quella stazionaria e riguardanti la cinetica di trasferimento di massa tra queste due fasi [12–14].

Dalla definizione dei momenti possiamo sapere che il momento zero, corrisponde all'area del picco:

$$m_0 = \int_0^{\infty} C(t)dt \quad (2.12)$$

il primo momento assoluto, corrisponde al tempo di ritenzione:

$$\mu_1 = \frac{\int_0^{\infty} tC(t)dt}{m_0} \quad (2.13)$$

e il secondo momento centrale, corrisponde alla varianza, σ^2 :

$$\mu_2' = \frac{\int_0^{\infty} (t - \mu_1)^2 C(t)dt}{m_0} \quad (2.14)$$

Attraverso la determinazione di questi parametri è possibile ricavare l'altezza di piatto teorico, utilizzando la seguente relazione:

$$H = \frac{L}{N} = \frac{\sigma^2}{t_R^2} L = \frac{\mu_2'}{\mu_1^2} L \quad (2.15)$$

2.4 Diffusione e cinetica in cromatografia: il bilancio di massa

Per studiare il comportamento cromatografico di uno o più componenti, si possono utilizzare diversi modelli. Il più semplice è il cosiddetto *modello ideale*, che assume che le due fasi (mobile e stazionaria) siano in condizioni di costante equilibrio e che non ci siano effetti di allargamento di banda di origine cinetica, in pratica si assume che la colonna abbia un'efficienza infinita. Nel caso del *modello dell'equilibrio dispersivo* invece, i trasferimenti cinetici risultano non infinitamente veloci, a causa del termine diffusivo, il coefficiente di dispersione apparente. Questo termine infatti tiene conto della diffusione e di tutti i fattori dispersivi che possono portare all'allargamento di banda, come ad esempio il trasferimento di massa esterno, la diffusione all'interno dei pori, la cinetica di adsorbimento-desadsorbimento e l'omogeneità del flusso.

Lo studio di un sistema cromatografico parte dalla definizione di *densità di flusso*, J , (eq. 2.16), che è definita come il numero di molecole che attraversano l'unità di area nell'unità di tempo. Il suo valore si può ricavare dalla seguente espressione:

$$J = Cu - D \frac{dC}{dz} \quad (2.16)$$

dove C è la concentrazione del componente in fase mobile, u è la velocità lineare della fase mobile, D è il coefficiente di diffusione assiale, e z la posizione lungo la colonna. La parte $-D \frac{dC}{dz}$ riprende la prima legge sulla diffusione di Fick.

L'accumulo lungo l'asse z dalla differenza di due J successivi al tempo t può essere espresso come:

$$J_z - J_{z+dz} = \frac{dC}{dt} dz \quad (2.17)$$

Il valore di J_{z+dz} può essere espresso tramite l'espansione della serie di Taylor attorno al punto z :

$$J_{z+dz} = J_z + \frac{dJ}{dz} dz \quad (2.18)$$

trascurando i termini di ordine successivo. Introducendo questa espressione nell'equazione 2.17 si ricava l'*Equazione di Continuità* (eq. 2.19):

$$-\frac{dJ}{dz} = \frac{dC}{dt} \quad (2.19)$$

dove è descritto l'accumulo in una parte di colonna (dz) di una concentrazione in un dato periodo di tempo (dt) [2]. Reintroducendo a questo punto la definizione di densità di flusso dall'equazione 2.16 si ottiene:

$$-u\frac{dC}{dz} + D\frac{d^2C}{dz^2} = \frac{dC}{dt} \quad (2.20)$$

Considerando il fenomeno di adsorbimento, la porosità della colonna e l'accumulo del componente in fase stazionaria, questo bilancio può essere espresso come:

$$\varepsilon\frac{dC}{dt} + (1 - \varepsilon)\frac{dq}{dt} = \varepsilon D\frac{d^2C}{dz^2} - \varepsilon u\frac{dC}{dz} \quad (2.21)$$

dove ε è la porosità della colonna ricavabile dal rapporto tra l'hold up volume (V_0) e il volume della colonna (V_{col}), mentre q è la concentrazione del componente in fase stazionaria. Introducendo il rapporto tra le fasi F , dato dal rapporto tra il volume della fase stazionaria (V_s) e l'hold up volume ($F = V_s/V_0 = (1 - \varepsilon)/\varepsilon$), si arriva a scrivere l'equazione per il *Bilancio di Massa*, che descrive l'accumulo in uno strato infinitesimo di colonna, e viene espressa nel seguente modo:

$$\frac{\partial C}{\partial t} + F\frac{\partial q}{\partial t} + u\frac{\partial C}{\partial z} = D\frac{\partial^2 C}{\partial z^2} \quad (2.22)$$

Il primo termine dell'equazione rappresenta l'accumulo in fase mobile, il secondo l'accumulo in fase stazionaria, il terzo è il termine riguardante il flusso convettivo, mentre il primo termine a destra rappresenta il flusso diffusivo [9]. Questa equazione è basata sul modello dell'equilibrio dispersivo, per cui la cinetica di trasferimento di massa e l'efficienza della colonna risultano sufficientemente elevate, ma non infinite. In questo caso il termine D rappresenta il coefficiente di dispersione apparente, che in condizioni lineari viene calcolato con l'espressione:

$$D = \frac{uL}{2N} \quad (2.23)$$

dove L è la lunghezza della colonna e N è il numero di piatti teorici.

Nel caso del modello ideale, invece, si assume che l'efficienza della colonna sia infinita, e anche la velocità dei trasferimenti di massa. In questo secondo caso l'equazione del bilancio di massa diventa:

$$\frac{\partial C}{\partial t} + F \frac{\partial q}{\partial t} + u \frac{\partial C}{\partial z} = 0 \quad (2.24)$$

il coefficiente di dispersione assiale nel caso del modello ideale risulta pari a zero. Dall'equazione del bilancio di massa, passando attraverso la trasformazione di Laplace è possibile ricavare il valore dei momenti per descrivere il picco cromatografico e determinare l'efficienza della colonna [15].

Altri tipi di modelli utili per determinare gli effetti termodinamici che prendono forma nella colonna cromatografica sono il cosiddetto *General Rate Model* e il *Lumped Pore Model*.

In *General Rate Model* è il modello più completo per descrivere un sistema cromatografico, ma è anche molto complesso [16]. Esso si serve di due bilanci di massa, uno riguardante la fase stazionarie e uno per la fase liquida [5]. Quello per la fase liquida include l'accumulo del componente nel film di fase mobile stagnante che ricopre la particella adsorbente, i trasferimenti di massa esterni attraverso il film superficiale, i fenomeni di convezione e di dispersione assiale, la diffusione nei pori, la diffusione superficiale e la cinetica di adsorbimento e desadsorbimento [6].

In diversi casi la cinetica di trasferimento di massa è relativamente veloce ed il *General Rate Model* può essere sostituito con il *Lumped Pore Model (POR)* [17], un modello più semplice in cui tutti i contributi alla resistenza del trasferimento di massa tra la fase mobile percolante attraverso il letto poroso e il fluido stagnante presente nei pori delle particelle del materiale impaccante, sono raggruppate in una singola equazione cinetica, utilizzando una costante apposita, il coefficiente di trasferimento della massa complessiva, k_0 . Questo modello è spesso utilizzato per calcolare i profili di banda e per la determinazione di diversi parametri [18]. Anche nel *Lumped Pore Model* si utilizza un set di due equazioni di bilancio di massa, una per la fase mobile percolante attraverso il letto poroso, e l'altra per il fluido stagnante presente nei pori delle particelle del materiale impaccante.

2.4.1 Velocità e forme del picco

In cromatografia liquida, il trasferimento di molecole individuali e la propagazione di una concentrazione sono fenomeni fisici differenti. Per molecole individuali la velocità è governata dal coefficiente di partizione, cioè dalla tangente dell'isoterma. Per quanto riguarda l'impulso di concentrazione, la velocità è governata dalla pendenza dell'isoterma alla data concentrazione. Con il modello ideale si possono ricavare informazioni riguardanti la termodinamica del sistema direttamente dalla forma del picco. L'equazione differenziale 2.24 può essere riscritta nel seguente modo:

$$\frac{\partial C}{\partial t} + \frac{u}{1 + F \frac{\partial q}{\partial C}} \frac{\partial C}{\partial z} = 0 \quad (2.25)$$

In questo caso la velocità di migrazione di un dato componente risulta essere pari a u_z :

$$u_z = \frac{u}{1 + F \frac{dq}{dC}} \quad (2.26)$$

La velocità u_z risulta essere dipendente solo dalla concentrazione C , a cui è associata. Così risulta che la velocità associata ad una data concentrazione risulta costante, e ogni concentrazione si propaga attraverso la colonna ad una velocità costante. Rappresentando in un diagramma spazio-tempo queste concentrazioni si nota che il punto che le rappresenta si muove lungo una retta. Se l'isoterma è lineare tutte le concentrazioni si muovono alla stessa velocità, le varie rette per ogni diversa concentrazione risultano sovrapposte.

Le molecole contenute in un volume di soluzione a concentrazione C non migrano alla velocità u_z associata proprio alla concentrazione C , ma migrano alla velocità dello shock (U_s), data dalla pendenza della corda dell'isoterma nel punto C . Dato che la corda ha una pendenza diversa rispetto all'isoterma, la velocità di propagazione delle molecole risulta diversa rispetto alla velocità di propagazione della concentrazione. Perciò, la velocità di propagazione dello shock di concentrazione è data da:

$$U_s = \frac{u}{1 + F \frac{\Delta q}{\Delta C}} \quad (2.27)$$

U_s rappresenta così la velocità dello shock, ed è legata alla pendenza della corda

dell'isoterma, u invece, è la velocità legata alla concentrazione, ed è connessa alla pendenza dell' isoterma. La velocità di uno shock rappresenta anche la velocità delle molecole in un volume di fase mobile alla concentrazione C [5].

Nel caso di un'isoterma lineare il cromatogramma ideale sarebbe rappresentato dalla funzione delta di Dirac, ma a causa dei fenomeni di allargamento di banda si ha all'uscita della colonna un picco gaussiano (Figura 2.9 parte *a*). Nel caso di un'isoterma di tipo Langmuir, con convessità verso l'alto, la velocità associata ad una concentrazione aumenta proporzionalmente all'aumentare della concentrazione. Questo porta ad un profilo di banda composto da uno shock sul fronte ed un retro diffuso. Questo avviene perché le alte concentrazioni si muovono più velocemente di quelle basse in quanto le alte concentrazioni sono meno ritenute di quelle basse, U_s aumenta all'aumentare della concentrazione, le molecole adsorbite all'equilibrio diminuiscono con l'aumentare della concentrazione, come riportato nella parte centrale della Figura 2.9 (parte *b*). Nel caso invece di un isoterma tipo anti-Langmuir, convessità verso il basso, la velocità associata alla concentrazione diminuisce all'aumentare della concentrazione, lo shock viene a trovarsi nella parte posteriore del picco, le basse concentrazioni si muovono più velocemente di quelle alte ma non possono superarle. La forma dei picchi rispetto all'andamento delle rispettive isoterme è riportata in Figura 2.9 parte *c*.

2.5 Teoria dell'adsorbimento

I componenti dell'eluente hanno diversi tipi di interazione con la superficie adsorbente, la fase liquida in prossimità della superficie può così risultare essere arricchita del modificatore organico presente in fase mobile (in cromatografia di fase inversa). L'adsorbimento avviene quando una soluto si accumula su un adsorbente formando un film superficiale detto adsorbato. Esistono vari tipi di interfacce: in cromatografia liquida l'interfaccia di interesse è quella liquido - solida [19].

L'accumulo di un componente in prossimità di un superficie adsorbente è dovuto all'effetto delle forze superficiali. Utilizzando una fase mobile composta da due componenti, l'accumulo di uno dei due sulla superficie(o in prossimità della stessa) causa lo spostamen-

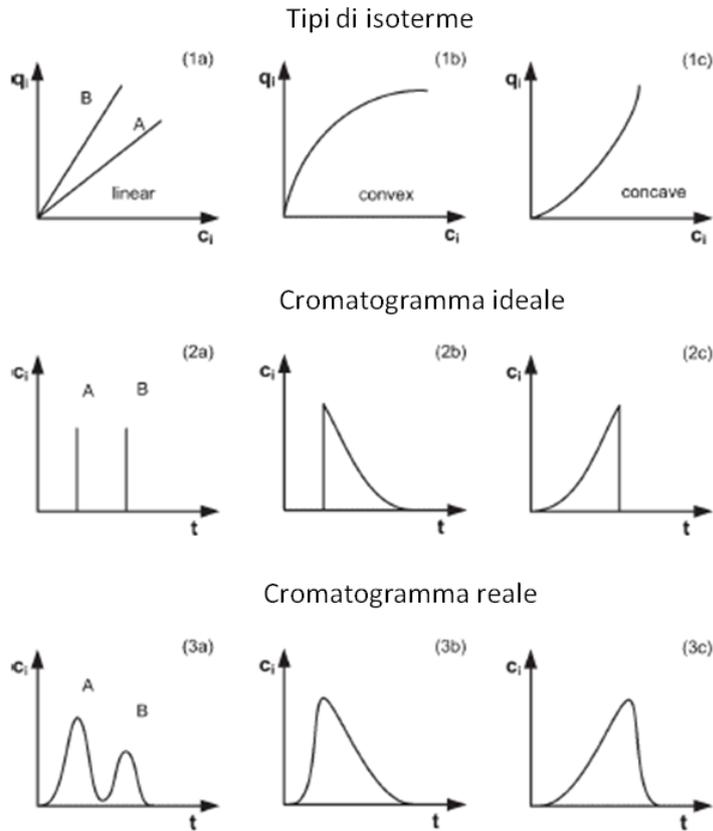


Figura 2.9: Relazione tra forme isoterma equilibrio e forma picco

to e la diffusione dell'altro componente nel bulk della fase. All'equilibrio, la concentrazione totale del componente adsorbito in prossimità della superficie sarà maggiore della concentrazione del componente nel bulk, ed è definita come concentrazione dell'eccesso superficiale (Γ). Il valore di Γ si può ottenere dall'espressione:

$$\Gamma_i = \frac{(x_i^\sigma - x_i^1)n^\sigma}{A_S} = \frac{n_i^\sigma - x_i^1 n^\sigma}{A_S}, i = 1, 2 \quad (2.28)$$

dove n^σ è la quantità totale di materiale sulla fase adsorbita, x_i^σ la frazione molare del componente i -esimo sulla fase adsorbita (con $i=1,2$), n_i^σ è la frazione molare dell' i -esimo componente nel bulk della soluzione e A_S l'area superficiale. Questo ultimo valore per il calcolo dell'isoterma può essere scambiato con il volume della fase stazionaria [5, 20]. In cromatografia non lineare la concentrazione superficiale è generalmente espressa come

numero di moli, o grammi, per unità di volume di fase stazionaria, e viene indicata con q . Per studiare l'adsorbimento viene spesso utilizzata l'equazione di bilancio di massa (equazione 2.22), che descrive l'accumulo di una quantità di materiale in una parte infinitesimale di colonna, dovuto ai processi di convezione e diffusione, e risulta necessaria per correlare la concentrazione di un componente in fase stazionaria in equilibrio con la sua concentrazione in fase mobile [21].

2.6 Isoterme

L'isoterma di adsorbimento lega la concentrazione di un analita in fase stazionaria, in genere indicata come q , con la concentrazione dello stesso in fase mobile, C , ad una data temperatura. Il tipo di isoterma che si profila per una dato sistema è legata all'omogeneità o disomogeneità della superficie, e al fatto che le interazioni adsorbato-adsorbato siano o meno trascurabili. Per descrivere il comportamento di un soluto che si adsorbe su una fase stazionaria esistono diversi tipi di isoterme. In genere gli analiti vengono iniettati nella colonna cromatografica a concentrazioni molto bassa, in modo da considerare solo la parte lineare della loro isoterma (regione di Henry). A concentrazioni basse, vengono prese in considerazione solo le interazioni analita-solvente, e si può assumere che l'analita si sposti attraverso la colonna in accordo con la pendenza della sua isoterma (costante di Henry), ma questa pendenza dipende anche dalla composizione dell'eluente [20].

2.6.1 Isoterme di eccesso e teoria adsorbimento di Gibbs

La ritenzione è legata ai processi di adsorbimento che avvengono sulla superficie e all'interno dei pori della fase stazionaria. Utilizzando la concentrazione superficiale e il concetto di Gibbs di eccesso di adsorbimento, è possibile descrivere l'adsorbimento da una miscela binaria senza la definizione del volume di fase adsorbita [22]. Due importanti definizioni nel campo dell'adsorbimento sono la definizione di eccesso superficiale, che misura l'impoverimento nel bulk di un componente rispetto all'arricchimento dello stesso componente sulla superficie, e la definizione di concentrazione superficiale, che è la quantità di un com-

ponente adsorbito sulla fase rispetto al suo eccesso relativo in bulk [23]. Alcuni dei primi esperimenti di adsorbimento di un liquido su un'interfaccia solida sono stati effettuati da Freundlich [24]. L'eccesso di adsorbimento è definito come la differenza tra la quantità del componente in un sistema ipotetico con le stesse condizioni geometriche ma senza gli effetti di influenza della superficie, e lo stesso sistema con l'influenza della superficie [20]. L'eccesso di adsorbimento (q) è la quantità in eccesso del campione sulla fase adsorbente per unità di superficie, e si può determinare dalla seguente espressione:

$$q = V_0 C_0 - V_0 C_e \quad (2.29)$$

dove V_0 è il volume C_0 è la concentrazione iniziale e C_e è la concentrazione all'equilibrio.

L'adsorbimento rappresenta l'accumulo di un componente in prossimità della superficie adsorbente, sotto l'influenza di forze superficiali. In una soluzione binaria, questo accumulo è accompagnato dal conseguente spostamento di un altro componente (solvente) dalla regione superficiale al bulk della soluzione. All'equilibrio una data quantità di soluto sarà accumulata sulla superficie, in eccesso rispetto alla sua concentrazione nel bulk della soluzione, come mostrato nella Figura 2.10, in cui C_0 rappresenta la concentrazione iniziale di analita e C_e la concentrazione all'equilibrio [25].

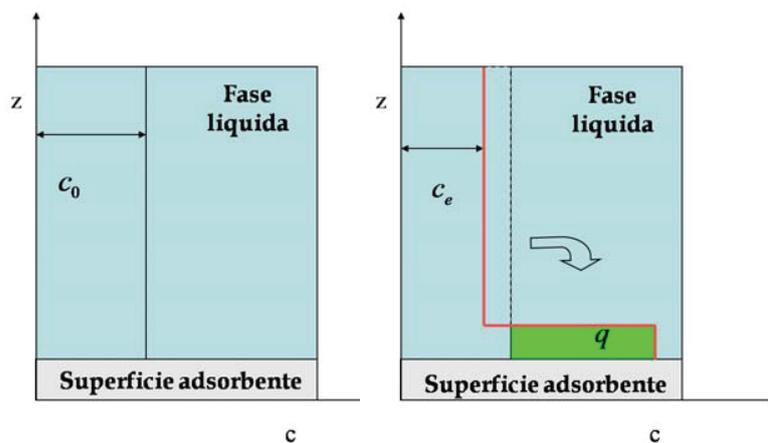


Figura 2.10: Sistema prima dell'equilibrio e quando l'equilibrio è stato raggiunto

Un modello piuttosto semplice di isoterma può essere descritto dalla seguente espres-

sione:

$$n_i^l = \frac{aX_i(1 - X_i)}{1 + bX_i} \quad (2.30)$$

dove n_i^l sono le moli del componente i nella fase liquida, X_i è la concentrazione del componente all'interfaccia e a e b sono costanti del sistema [5].

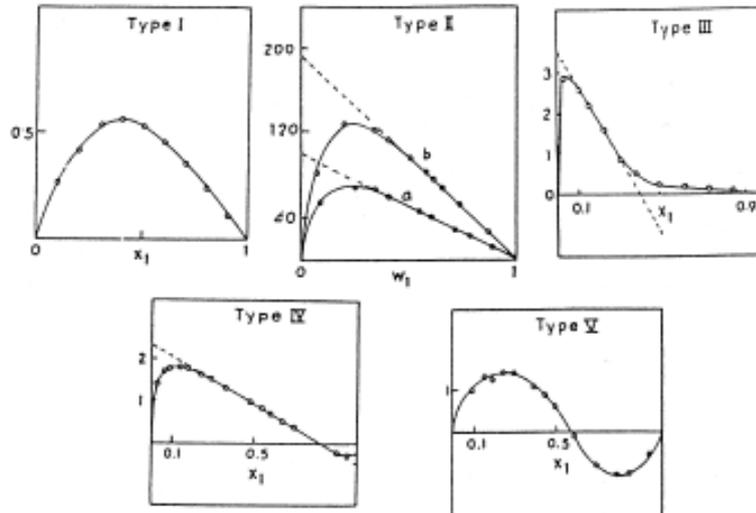


Figura 2.11: Diverse forme isoterme di eccesso

L'isoterma di eccesso derivante da questo genere di esperimenti in genere riporta l'eccesso superficiale (Γ_1^n , mmol/g, dove n è il numero totale di moli dei componenti 1 e 2) vs. la frazione molare (X_1). Questa può avere diverse forme [23], e ovviamente nei punti in cui è presente il liquido puro, l'isoterma cade a zero. Ad esempio nella figura 2.11, nel primo tipo di isoterma il grafico ha un massimo quando la frazione molare del componente ha un valore di 0.5. Nel secondo tipo c'è ancora la presenza di un massimo, ma si trova a un valore di frazione molare più basso. Nell'isoterma di terzo tipo la curva presenta anche un punto di flesso, che però non interseca l'asse delle concentrazioni ed il massimo è presente a bassi valori di frazioni molari. Dall'isoterma di *Tipo IV* invece, nel caso di cromatografia in fase inversa ad esempio, per cui la fase stazionaria è apolare e la fase mobile polare, si nota nell'ultima parte della figura, cioè ad elevate concentrazioni del solvente organico, un adsorbimento preferenziale del componente di fase mobile più polare, che può indicare la presenza di silanoli liberi presenti in superficie. Dall'isoterma *Tipo V*, si

può distinguere chiaramente una prima parte in cui c'è l'adsorbimento preferenziale di un componente e una seconda parte in cui l'adsorbimento del secondo componente diventa preferenziale [25].

2.6.2 Isoterma Langmuir

Nell'isoterma dell'Eq.2.30, quando la concentrazione X_i è sotto il valore di 0.1, condizione quasi sempre verificata in cromatografia liquida, l'isoterma si riduce all'isoterma di tipo Langmuir [5]. L'isoterma di tipo Langmuir [26] è il modello più comune e semplice di isoterma non-lineare, valido per una superficie omogenea senza la presenza di interazioni adsorbato-adsorbato, ed in genere è presentato con la seguente equazione:

$$q = \frac{aC}{1 + bC} \quad (2.31)$$

dove q rappresenta la concentrazione del componente adsorbito sulla fase stazionaria all'equilibrio, mentre C è la concentrazione in fase mobile; a e b rappresentano i coefficienti dell'isoterma. Il parametro a è dato dal rapporto tra il fattore del limite di ritenzione del composto in condizioni di diluizione infinita (k_0) e il rapporto di fase (Φ). Il parametro b è dato dal rapporto tra a e la capacità di saturazione della colonna (q_s) [27]. Questo modello può anche essere descritto con la seguente equazione:

$$q = \frac{q_s b C}{1 + b C} \quad (2.32)$$

In questa equazione il prodotto bC spiega la deviazione dalla linearità dell'isoterma. Utilizzando questo modello ci sono diverse condizioni da rispettare: il processo deve avvenire ad una temperatura costante, la velocità del flusso di fase mobile deve essere mantenuta costante, la compressibilità della fase mobile viene considerata trascurabile, l'impaccamento della colonna omogeneo, e si viene a formare un equilibrio locale tra i componenti su uno strato e la fase all'interno dei macropori della fase stazionaria e i coefficienti di dispersione dei componenti devono essere costanti [28].

2.6.3 Isoterma Bi-Langmuir

Questo modello può essere utilizzato quando la superficie adsorbente non è omogenea (senza la presenza di interazioni adsorbato-adsorbato), per esempio considerando una fase stazionaria composta da una silice derivatizzata con catene alchiliche di 8 unità. Oltre alle catene C8 saranno presenti anche gruppi silanolici Si-OH. Il modello Bi-Langmuir assume la presenza di due diversi e indipendenti tipi di siti attivi (1 e 2), e la rispettiva equazione che lo rappresenta è la seguente:

$$q = \frac{q_{S1}b_1C}{1 + b_1C} + \frac{q_{S2}b_2C}{1 + b_2C} \quad (2.33)$$

dove q_{S1} e b_1 si riferiscono al primo sito attivo e q_{S2} e b_2 al secondo. L'isoterma di equilibrio deriva dalla somma di due isoterme, una per ogni tipo di sito attivo [28].

2.6.4 Isoterma Toth

Con questo terzo metodo, l'isoterma di Toth, un' ulteriore parametro entra in gioco per la descrizione dell'adsorbimento: n . Questo parametro serve a considerare l'eterogeneità delle distribuzioni delle energie di adsorbimento. L'isoterma Toth viene descritta dalla seguente equazione:

$$q = \frac{q_s b C}{[1 + (bC)^n]^{1/n}} \quad (2.34)$$

In questo caso l'adsorbimento avviene su una fase stazionaria con una superficie eterogenea, senza nessuna interazione di tipo "adsorbato-adsorbato". Nel caso in cui il parametro n risulti uguale all'unità, il caso dell'isoterma ricade nel tipo Langmuir. [28].

2.6.5 Isoterma Langmuir-Freundlich

Un altro tipo di modello utilizzabile per descrivere un sistema è il modello cosiddetto "Langmuir-Freundlich". In questo caso il parametro p considera l'eterogeneità della fase stazionaria e l'equazione dell'isoterma diventa:

$$q = \frac{q_s (bC)^p}{1 + (bC)^p} \quad (2.35)$$

2.6.6 Isoterma Quadratica

Nel caso in cui la superficie sia eterogenea e le interazioni adsorbato-adsorbato non siano trascurabili, viene utilizzato un modello di isoterma più complesso, come l'isoterma quadratica a singolo componente (Eq. 2.36):

$$q = \frac{A_1c + A_2c^2}{1 + B_1c + B_2c^2} \quad (2.36)$$

dove i parametri A_1 , A_2 , B_1 e B_2 possono essere aggiustati considerando il comportamento dell'adsorbimento (interazioni tra i componenti, non interazioni, formazione di mono-strati, bi-strati o multi-strati di adsorbimento). Si possono anche considerare le competizioni per l'adsorbimento del solvente. Lavorando in fase inversa, ad esempio, le molecole del solvente meno polare possono essere preferenzialmente adsorbite sulla fase stazionaria apolare [27].

2.7 Misura delle isoterme

In ambito cromatografico la misura delle isoterme di adsorbimento può avvenire tramite diversi metodi, ad esempio con l'analisi frontale, i metodi perturbativi oppure con i metodi inversi. Alcuni di questi metodi sono ad alto dispendio di tempo e consumabili, altri invece più complicati da attuare.

2.7.1 Analisi frontale

Nell'analisi frontale nella colonna condizionata con solvente puro, viene iniettata una soluzione di analita a concentrazione nota: dalla tipica curva di breakthrough [29] si ricava un punto per l'isoterma, utilizzando la semplice espressione:

$$q = C \frac{V_b - V_d}{V_{ads}} \quad (2.37)$$

dove q è la concentrazione dell'analita in fase stazionaria, C la concentrazione dell'analita in fase mobile, V_b è il volume corrispondente al punto di flesso della curva del cromatogramma, ottenibile moltiplicando il valore di tempo per il flusso della fase mobile, V_d è

il cosiddetto "volume morto" del sistema, dato dalla somma del volume extra colonna e dal volume vuoto della colonna e V_{ads} è il volume della fase adsorbente, ottenuto dalla differenza tra il volume totale della colonna e il volume vuoto. Nel caso in cui la colonna sia condizionata non semplicemente con fase mobile ma con una soluzione di analita a concentrazione nota (C_0) si deve tenere in considerazione anche questo fattore, e l'equazione precedente diventa:

$$q(C_x) = q(C_0) + \frac{(C_x - C_0)(V_b - V_d)}{V_{ads}} \quad (2.38)$$

Variando la concentrazione della soluzione iniettata varia la posizione del flesso della curva, e il valore del punto sull'isoterma. Questo metodo è tra i più accurati ma necessita di una quantità elevata di analita e di solventi e di un lungo tempo.

2.7.2 Perturbazioni

In questo secondo metodo la colonna viene equilibrata a diverse concentrazioni di analita, e vengono fatte delle perturbazioni del sistema iniettando delle piccole quantità dell'analita stesso. Considerando l'equazione del bilancio di massa (2.25) e la velocità di migrazione u_z di un dato componente (2.26), risulta possibile determinare l'eccesso di adsorbimento dalla misura del volume di ritenzione considerando i seguenti passaggi:

$$T_R(C) = t_0 \left(1 + F \frac{\partial q}{\partial C} \right) \quad (2.39)$$

$$V_R(C) = V_0 \left(1 + F \frac{\partial q}{\partial C} \right) = V_0 + V_S \frac{\partial q}{\partial C} \quad (2.40)$$

$$\int \frac{V_R(C) - V_0}{V_S} dC = \int \frac{\partial q}{\partial C} dC = q \quad (2.41)$$

dove T_R è il tempo di ritenzione, t_0 è il tempo morto (hold up time), F il rapporto di fasi, $\frac{\partial q}{\partial C}$ la pendenza dell'isoterma nel punto di concentrazione C , V_R il volume di ritenzione, V_0 il volume morto e V_S il volume della fase stazionaria. Quest'ultimo parametro sostituisce il valore della superficie A_S che si trova nella definizione dell' eccesso

superficiale definito nell'Equazione 2.28. L'area S superficiale e il volume morto V_0 sono proprietà del sistema cromatografico. Attraverso una serie di misure di ritenzione di perturbazioni nell'intero range di concentrazione di un sistema è possibile il calcolo dell'eccesso di adsorbimento di un componente utilizzando la formula 2.41 [20]. Nella parte lineare dell'isoterma le perturbazioni hanno lo stesso tempo di ritenzione dei picchi (le molecole vanno alla stessa velocità delle concentrazioni, la tangente e la corda dell'isoterma hanno la stessa pendenza). A concentrazioni più elevate questo non avviene. Nel caso di un'isoterma di tipo Langmuir, ad esempio, le molecole hanno una velocità inferiore della concentrazione, all'uscita della colonna, con un opportuno rivelatore, si possono misurare due punti ben separati.

2.7.3 Metodi inversi

I metodi inversi permettono di ottenere l'isoterma da poche iniezioni di campione a diverse concentrazioni [30–32]. Questo approccio permette un grande risparmio di tempo e di quantità di consumabili. I parametri dell'isoterma sono ottenuti dalla risoluzione iterativa dell'equazione di bilancio di massa, aggiustando i parametri che descrivono l'adsorbimento fino a ritrovare un paragone ottimale tra i profili calcolati e quelli ottenuti sperimentalmente.

Attraverso l'utilizzo di un metodo numerico si può determinare il fitting migliore per i dati sperimentali per determinare il modello dell'isoterma da utilizzare. Con questo metodo è necessario conoscere a priori un modello di isoterma da utilizzare, in seguito si risolve l'equazione di bilancio di massa e infine vengono minimizzati i vari parametri al fine di poter paragonare i picchi misurati con quelli calcolati.

3.1 Caratterizzazione dell'eterogeneità del processo di adsorbimento

La caratterizzazione di fasi stazionarie in termini di distribuzione di energie di adsorbimento (AED) studiando l'eterogeneità superficiale, è stata effettuata attraverso misure di isoterme di eccesso. Lo studio di una superficie eterogenea viene fatto caratterizzando i vari siti attivi presenti e la loro locazione e determinando un'isoterma sperimentale che la caratterizza [5,33–37]. Quest'isoterma viene ottenuta dalla somma delle varie isoterme su ogni tipo di sito attivo della superficie. Dati utili si possono ottenere confrontando un'isoterma calcolata, ad esempio con il modello dell'equilibrio dispersivo (equilibrio istantaneo tra fase mobile e stazionaria, efficienza finita, coefficiente di dispersione assiale che tiene conto di effetti dispersivi ed effetti di non equilibrio) con un'isoterma misurata (ad esempio con l'analisi frontale) [38]. L'adsorbimento preferenziale di un solvente organico o acquoso su una fase stazionaria dipende dai gruppi funzionali presenti su questa fase e dalle specifiche interazioni che possono intercorrere tra i solvente e i siti attivi [39].

Il lavoro svolto si è concentrato sullo studio dell'adsorbimento di miscele binarie, misurando le isoterme di eccesso di diversi sistemi di frequente utilizzo, come metanolo-acetonitrile, etanolo-esano, acqua-acetonitrile, acqua-metanolo, isopropanolo-acetonitrile, esano-isopropanolo su silice derivatizzata con catene di carboni lunghe diciotto unità (C18), lavorando perciò in fase inversa. Tramite questo tipo di studio è stato possibile individuare i meccanismi di interazione che permettono l'adsorbimento selettivo di un composto rispetto ad un altro (interazioni idrofobiche, legami idrogeno, interazioni dipolari). Questo studio ha consentito di caratterizzare l'adsorbimento dei cosiddetti modificatori di fase mobile sulle diverse fasi, per interpretarne il comportamento cromatografico, e di caratterizzare l'eterogeneità della fase adsorbente [40]. In questo lavoro si è utilizzato come detector un rivelatore ad indice di rifrazione, dato che con un detector differente ci sarebbero state delle difficoltà di detezione dei vari picchi corrispondenti alle minime perturbazioni effettuate del sistema. E' stato investigato l'effetto della temperatura e del tipo di solvente sulla fase stazionaria, che in alcuni casi può modificarne la struttura, ad esempio dando ai silanoli superficiali maggiore o minore accessibilità.

3.1.1 Caratterizzazione della fase stazionaria C18

La superficie delle particelle di silice porose usate in RPLC è in genere derivatizzata attraverso una reazione con octadecildimetilclorosilano, per legare le catene C_{18} . Questa reazione di derivatizzazione non può essere completa, e diversi gruppi silanolicci isolati rimangono liberi, dando forti interazioni con i composti basici, interazioni che possono causare codatura del picco. Per diminuire la densità di questi gruppi silanolicci residui, la superficie derivatizzata viene fatta reagire con trimetilclorosilano, una reazione conosciuta come *endcapping* [41]. Anche dopo questo procedimento, sulla superficie sono ancora presenti gruppi residui di silanoli e ciò porta all'adsorbimento fisico dei composti polari. Questo si rende evidente nel cromatogramma dall'allargamento del picco (tailing) causato dal ritardato desorbimento.

La mancanza di simmetria in RPLC è data dalla mancanza di omogeneità superficiale e, più specificatamente, dalla presenza di gruppi indesiderati, come ad esempio isolati

gruppi silanologici all'interno della colonna ricoperta di catene carboniose. In base al pH utilizzato durante la separazione cambia la ionizzazione di questi gruppi. Anche la mancanza di omogeneità nella struttura delle catene alchiliche legate può causare la codatura dei picchi in uscita dalla colonna. Queste catene hanno uno spessore finito, la loro densità è minore rispetto a quella di un liquido, ed hanno perso il loro grado di libertà traslazionale. Nel sistema cromatografico in genere l'area di contatto tra la superficie adsorbente e le molecole di analita non è molto elevata e la costante di equilibrio dell'adsorbimento tra le molecole di analita e i siti attivi della fase stazionaria è abbastanza piccola. Le molecole di analita, se sufficientemente piccole, possono penetrare tra le catene alchiliche, in regioni in cui l'area di contatto è molto maggiore. Una bassa densità di siti di adsorbimento porta ad un ridotto range di concentrazione in cui l'isoterma risulta lineare. il limite massimo di concentrazione misurabile per un analita in genere è determinato dalla sua solubilità in fase mobile. Lavorando a basse concentrazioni si incontrano invece problemi riguardo i lunghi tempi di eluizione delle curve di breakthrough. I siti ad elevata energia presenti sulla fase stazionaria possono essere considerati i responsabili di questo allungamento. Per questi motivi risulta necessario caratterizzare i vari tipi di siti attivi presenti sulla superficie adsorbente, determinando le loro capacità di saturazione e le costanti di equilibrio [42].

Per il nostro lavoro è stata utilizzata una colonna Symmetry 300 (Waters, Ma, USA) 4.6mm x 150mm con un diametro delle particelle (d_p) di $5\mu\text{m}$. Questa colonna è stata sottoposta al processo di endcapping, la grandezza dei suoi pori è di 300\AA , ha una percentuale di carbonio legata pari al 8.5%, un'area superficiale di $110\text{m}^2/\text{g}$, può lavorare in un range di pH tra 2 e 8 e (da quanto riportato dalla ditta di fabbricaione) presenta una bassa attività dei silanoli.

3.1.2 Misura isoterme di eccesso

Per determinare il volume morto della colonna (hold up volume) sono state eseguite delle misure di picnometria. La colonna inizialmente è stata riempita con un solvente ad una data densità (diclorometano, $d=1.325$) e pesata. Successivamente la colonna è stata

riempita e pesata con un solvente ad una densità diversa (tetraidrofurano $d=0.887$). Il volume morto è così determinato:

$$V_0 = \frac{m_{CH_2Cl_2} - m_{THF}}{d_{CH_2Cl_2} - d_{THF}} \quad (3.1)$$

Riempendo la colonna Symmetry con CH_2Cl_2 e pesandola si trova una massa di 58.5535g, mentre riempiendola con tetraidrofurano il peso è di 57.8128g. Il volume morto V_0 che si determina risulta essere pari a 1.691mL.

Al fine di studiare i processi di adsorbimento da soluzioni diluite per specie che sono fortemente ritenute, il sistema è stato equilibrato inizialmente con il solvente debole della miscela binaria, aumentando progressivamente per ogni serie di misure la concentrazione di solvente forte. Si procede allo studio dei picchi ottenuti tramite delle perturbazioni lineari, iniettando piccoli eccessi dei componenti da studiare [43], nel nostro caso con un loop da $2\mu L$ ad una velocità di flusso di $1mL/min$. Tutte le misure sono state effettuate con un cromatografo liquido tipo Agilent 1100 (Palo Alto, CA), composto da due pompe reciprocanti, un comparto termostato della colonna e un detector a indice di rifrazione (RID). Per le iniezioni si è utilizzata una valvola tipo Rheodyne 7725i (Cotati, CA) con loop interno.

L'isoterma di eccesso di un componente, calcolata per unità di superficie di fase adsorbente nel caso di una miscela binaria, è stata calcolata utilizzando la seguente espressione [44]:

$$\Gamma(C^*) = \int_0^{C^*} \frac{V_R - V_0}{A_S} dC \quad (3.2)$$

dove V_R rappresenta il volume di ritenzione delle perturbazioni, V_0 l'hold-up volume della colonna e A_S l'area superficiale dell'adsorbente ($110m^2/g$).

3.1.3 Discussione Risultati

In cromatografia liquida la ritenzione è governata da diversi tipi di interazioni: soluto-solvente, solvente-solvente, soluto-fase stazionaria e solvente-fase stazionaria. Quando una fase mobile binaria composta da un solvente acquoso ed uno organico è a contatto con una fase stazionaria composta da gruppi alchilici, le molecole di solvente organico

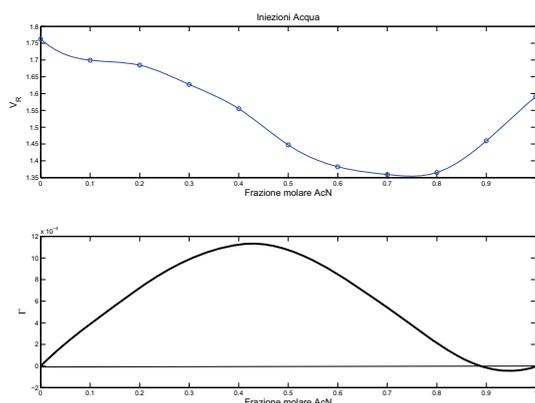


Figura 3.1: Isoterma eccesso Acetonitrile-Acqua

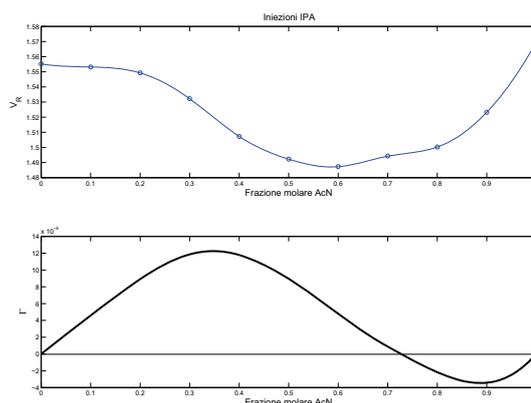


Figura 3.2: Isoterma eccesso Acetonitrile-Isopropanolo

vengono adsorbite sulla fase stazionaria grazie alle interazioni di tipo idrofobico, mentre il solvente acquoso può essere adsorbito sui silanoli liberi della fase attraverso legame idrogeno [45]. Le isoterme di eccesso misurano la differenza di adsorbimento del solvente e possono indicare le caratteristiche della fase stazionaria, come le caratteristiche idrofobiche, date dalla densità di coperture delle catene alchiliche, e le caratteristiche polari, causate dai silanoli rimasti liberi sulla superficie [46]. Dai dati misurati si ottengono informazioni riguardanti le diverse interazioni e la caratterizzazione delle eterogeneità della superficie di adsorbimento attraverso la costante di equilibrio o la determinazione della distribuzione dell'energia di legame (dai calcoli della distribuzione dell'energia di affinità o della dipendenza dalla temperatura della costante di equilibrio) [21].

Nelle figure 3.1-3.6 sono riportate le varie misurazioni fatte per i diversi sistemi studiati. Nella parte superiore delle figure sono riportati i valori del volume di ritenzione (V_R in mL), misurato dalla perturbazioni lineari, contro la concentrazione, espressa in frazione molare, di un componente della fase mobile (in genere il solvente cosiddetto forte). Nella parte inferiore delle figure sono riportate le isoterme di eccesso, ottenute dall'integrazione espressa nell'equazione 3.2, riportando il valore di Γ , espresso come moli per colonna, contro la frazione molare del solvente forte.

Tutte le isoterme determinate, escluso il caso Metanolo-Acqua, presentano un an-

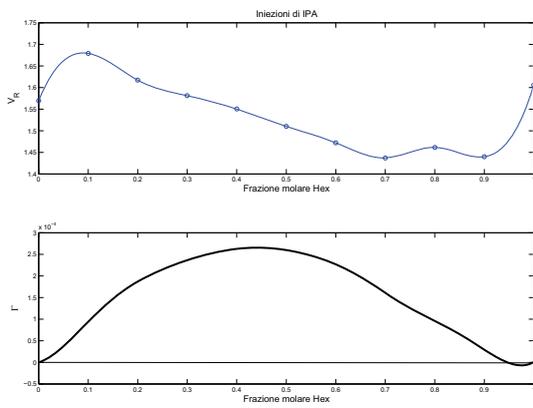


Figura 3.3: Isotherma eccesso Esano-Isopropanolo

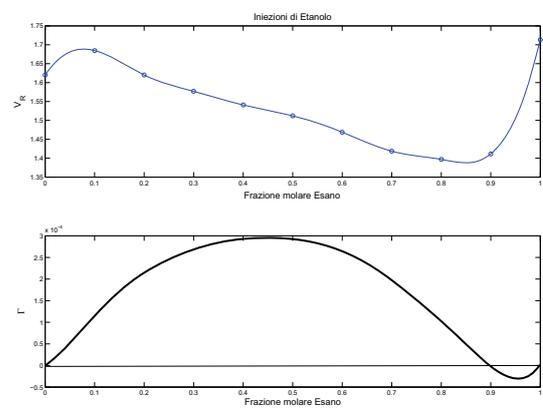


Figura 3.4: Isotherma eccesso Etanolo-Esano

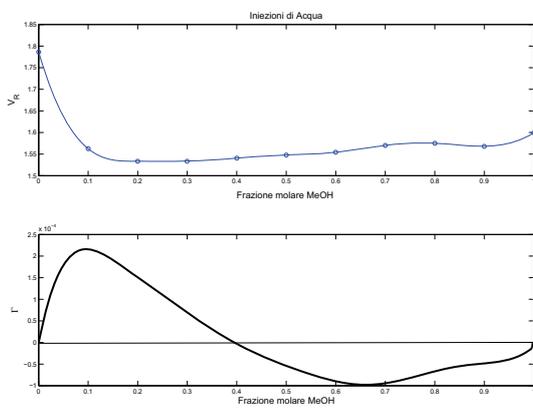


Figura 3.5: Isotherma eccesso Metanolo-Acqua

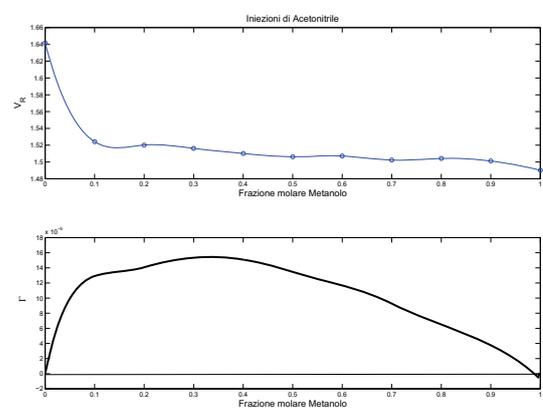


Figura 3.6: Isotherma eccesso Acetonitrile-Metanolo

damento abbastanza simile, che descrive un tipo di interazione preferenzialmente idrofobica. Le isoterme Acetonitrile-Acqua (Figura 3.1), Esano-Isopropanolo (Figura 3.3) ed Etanolo-Esano (Figura 3.4) presentano un massimo attorno al 45% di solvente forte, mentre l'isoterma Acetonitrile-Isopropanolo (Figura 3.2) presenta un massimo quando la composizione della fase mobile è al 35% di Acetonitrile. L'isoterma Acetonitrile-Metanolo (Figura 3.6) conferma l'adsorbimento preferenziale del metanolo. Ad elevate concentrazioni di solvente organico si può notare un adsorbimento preferenziale del solvente acquoso dalla parte negativa dell'isoterma di eccesso. Questa parte negativa diventa particolarmente significativa nel caso Metanolo-Acqua (riportato in Figura 3.5), infatti quando la composizione della fase mobile divente 40% metanolo e 60% acqua l'adsorbimento dell'acqua stessa diventa preferenziale. L'acetonitrile non può reagire con i silanoli residui e le molecole di acqua possono essere adsorbite su di essi. L'adsorbimento del solvente acquoso sui silanoli residui è maggiore quando la quantità di molecole di acqua in fase mobile diminuisce.

Questo tipo di studio ha caratterizzato le eterogeneità presenti sulla fase stazionaria [40]. Le perturbazioni sono state interpretate con la teoria di adsorbimento di Gibbs, al fine di determinare delle isoterme di adsorbimento che indicassero le preferenze di interazione dei siti attivi della fase stazionaria per i vari tipi di solventi studiati. Dalla forma delle diverse isoterme misurate si è verificata la presenza di silanoli liberi sulla colonna C18, anche se sottoposta a "endcapping", e l'interazione di questi gruppi con i diversi tipi di solventi.

3.2 Bi-dimensionale in gradiente

Un sistema cromatografico bi-dimensionale, non ortogonale, utilizzato per la separazione e deconvoluzione di picchi in analisi multicomponente in overloading, è stato utilizzato e sviluppato per la separazione di miscele in condizioni isocratiche o in gradiente [47]. Il sistema (schematizzato nella figura 3.7) è stato messo appunto per la separazione in condizioni isocratiche di diversi componenti di una miscela, usando due colonne con simile impaccamento, poste in serie. La strumentazione era fornita di due differenti sistemi di pompe reciprocanti, al fine di poter utilizzare diverse composizioni e condizioni di fasi mobili. Nella prima fase, quella di caricamento (loading), i componenti venivano iniettati in un loop di $500\mu l$ nella prima colonna, utilizzando delle pompe 515 Waters per HPLC e una valvola di iniezione Rheodyne 7725i. La prima colonna consisteva in una colonna Symmetry 300 (Waters, 4.6×150 mm, C18) con diametro delle particelle di $5\mu m$. Questa veniva interfacciata alla seconda colonna, XTerraMS (Waters, 4.6×50 mm, C8, $dp=5\mu m$) attraverso l'utilizzo di una valvola (Rheodyne EV700-102) 10 porte, 2 vie, che, passando da una posizione all'altra ad intervalli regolari, fase di campionamento (sampling), portava ad avere la separazione dei diversi componenti iniettati in condizioni di overloading. Come detector è stato utilizzato un rivelatore a serie di diodi a lunghezza d'onda multipla (Agilent 1100). Utilizzando questo arrangiamento strumentale è stata resa possibile la calibrazione di profili cromatografici di miscele multicomponente, con la trasformazione on-line dei picchi in overloading da unità di assorbanza, in unità di concentrazione.

Lavorando in condizioni isocratiche il sistema, testato con soluzioni di due e tre componenti, permetteva un'accurata ricostruzione dei picchi.

Il passaggio del metodo dalle condizioni isocratiche a quelle di gradiente comporta l'incremento della forza dell'eluente, aumentando le concentrazioni di modificatore organico presente nella fase mobile (frazione di Acetonitrile, ϕ), in questa maniera la solubilità dei componenti nella fase mobile aumentava. In genere incrementando a concentrazione del modificatore organico nella fase mobile, i fattori di ritenzione di ogni componente sono soggetti ad una diminuzione.

Lavorando in condizioni di gradiente le isoterme dei componenti analizzati diventano

funzioni del tempo e dello spazio, cosa che non avviene in condizioni isocratiche.

Nel nostro lavoro abbiamo studiato il comportamento in gradiente di due composti: l'Alcool Benzilico e il Fenolo. In condizioni isocratiche, con una fase mobile contenente il 20% di Acetonitrile e 80% di Acqua, i due componenti risultavano ben separati sulla seconda dimensione, ma lavorando con un gradiente nella prima direzione il primo componente eluito provocava una compressione o una parziale sovrapposizione con il secondo [48–51]. Aumentando la concentrazione di Acetonitrile in fase mobile, l'eluizione dei componenti in condizioni di overloading dalla prima colonna avviene in un range di tempo inferiore rispetto alle condizioni isocratiche, e mantenendo costante la frequenza di campionamento sulla seconda direzione si ottengono meno picchi rispetto a una cromatografia senza la variazione della composizione della fase mobile nella prima direzione. A causa della compressione esercitata dal gradiente sui componenti, l'altezza dei picchi può subire dei cambiamenti, e la successiva ricostruzione dei profili diventa più complicata.

Come riportato in Figura 3.8 , il cromatogramma ottenuto dal campionamento di una miscela di due componenti appare decisamente differente se sulla prima dimensione si utilizza un gradiente oppure se si lavora in condizioni isocratiche.

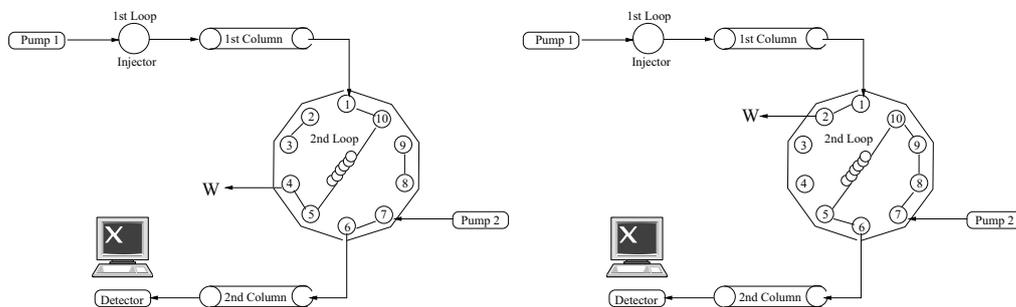


Figura 3.7: Configurazione del sistema bi-dimensionale, il gradiente viene applicato nella prima dimensione

Utilizzando lo stesso metodo applicato in condizioni isocratiche per calcolare i profili di concentrazione, sono state eseguite alcune misure di diverse soluzioni di Alcool Benzilico e Fenolo in diverse condizioni di gradiente, variando la pendenza della rampa. Le curve di calibrazione sono state misurate dalle altezze dei plateau iniettando concentrazioni note di componente e senza l'utilizzo di colonne. Gli altri parametri che influenzano il profilo di

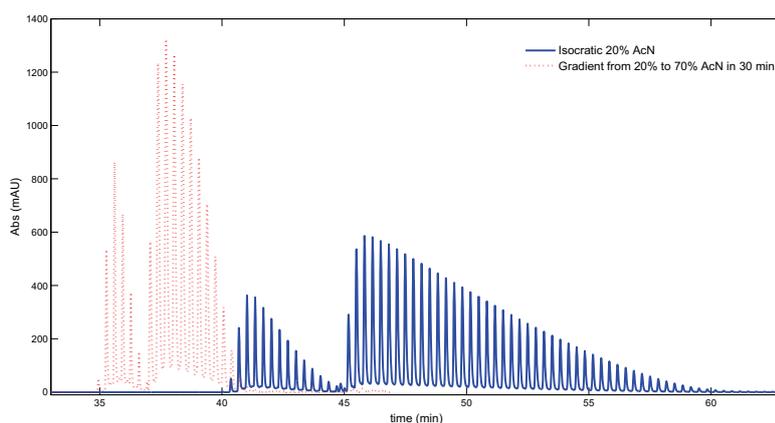


Figura 3.8: Paragone tra iniezione in condizioni isocratiche e in gradiente

concentrazione calcolato erano la velocità nella prima dimensione, la velocità nella seconda dimensione e il volume del loop prima della seconda colonna. Per valutare l'adeguatezza del metodo è stata fatta l'integrazione dei profili ottenuti e il valore di concentrazione ricavato è stato paragonato con quello conosciuto.

3.2.1 Teoria del Gradiente

Le eluizioni in gradiente vengono utilizzate in genere per ottenere la separazione di un elevato numero di componenti in un tempo non eccessivamente lungo. Lavorando in condizioni isocratiche l'isoterma di equilibrio durante tutta la separazione è la stessa lungo tutti i punti della colonna, lavorando invece in condizioni di gradiente l'isoterma dipende dal tempo e dalla posizione. Se la separazione avviene in condizioni non-lineari, la velocità associata ad una concentrazione varia durante la separazione, a causa del costante cambiamento della concentrazione del soluto e del modificatore [5]. L'eluizione in gradiente può essere interpretata come una serie di piccoli step in condizioni isocratiche, questo è l'approccio del cosiddetto modello "Linear Solvent Strength". Questo modello viene utilizzato per lo studio delle separazioni in condizioni di gradiente ed è fondato sull'approssimazione di una ritenzione del soluto di tipo isocratica come funzione della composizione della fase mobile. Il fattore di ritenzione (k') risulta legato al cambiamento

di composizione della fase mobile:

$$\log k'(\phi) = \log k'_0 - S\phi \quad (3.3)$$

dove S rappresenta una costante riguardante la composizione della fase mobile, e ϕ la frazione di modificatore organico. La larghezza della banda cromatografica in eluizioni di gradiente è determinata dal valore finale del fattore di ritenzione al tempo in cui la banda eluisce dalla colonna [52, 53].

Questo modello si basa sul fatto che la capacità di saturazione di tutti i componenti è la stessa e costante in tutto il range del gradiente. Spesso però questa approssimazione non si può considerare corretta dato che all'aumentare della percentuale del modificatore organico in genere la porosità della colonna diminuisce, e le concentrazioni più grandi passano attraverso la colonna a velocità maggiori rispetto alle concentrazioni minori [54].

Lavorando in fase in versa con un gradiente si può avere la formazione di un adsorbimento competitivo tra i componenti da separare e il modificatore organico. Lavorando in condizioni analitiche i campioni vengono iniettati in basse concentrazioni, le loro isoterme di adsorbimento sono lineari e le interazioni tra i vari componenti si possono considerare trascurabili. Quando dei modificatori vengono aggiunti all'eluente ad elevate concentrazioni, le loro isoterme di adsorbimento non sono lineari e possono competere con i componenti da separare per i siti attivi della fase stazionaria. La valutazione dei fattori di ritenzione dei vari soluti e della concentrazione del modulatore è la chiave per la selezione di un'ottima forza eluente o profilo di gradiente per una data separazione [55]. La velocità di separazione delle diverse bande cambia durante la separazione, e i tempi di eluizione finali dipendono dal soluto e dal sistema cromatografico che controlla la relazione tra il k' e l'attuale composizione della fase mobile. Nell' "eluizione ideale in gradiente", per calcolare i tempi di eluizione, si utilizzano alcune assunzioni per quanto riguarda l'equilibrio delle fase e il sistema utilizzato [56]:

1. Le interazioni tra i vari analiti e tra gli analiti e la la colonna non devono cambiare le proprietà della colonna stessa e i profili in gradiente non devono cambiare attraverso il loro spostamento lungo la colonna.

2. La cinetica di adsorbimento/desorbimento dei componenti in fase mobile e quelli in fase stazionaria deve essere abbastanza veloce da avere un equilibrio di tipo istantaneo.
3. La concentrazione del soluto deve essere abbastanza bassa da permettere che la sua isoterma di distribuzione tra fase mobile e fase stazionaria sia lineare (il fattore di ritenzione deve essere indipendente dalla concentrazione del soluto).
4. Il volume cosiddetto "morto" (hold-up volume) deve risultare costante durante l'eluizione in gradiente.
5. Nell'eluizione in gradiente la parte posteriore del picco si deve muovere lungo la colonna in fase mobile con una forza di eluizione maggiore, cioè più velocemente, del fronte del picco.

Per definire il gradiente utilizzato si utilizza un parametro riguardante la pendenza del gradiente, b_s , che viene definito dalla seguente espressione:

$$b_s = \frac{t_0 S \Delta \phi}{t_G} \quad (3.4)$$

dove t_0 è l'hold-up time, S è il parametro che lega il $\log k'$ alla concentrazione ϕ nell'equazione 3.3, $\Delta \phi$ è la variazione di concentrazione del gradiente e t_G è il tempo del gradiente [56].

3.2.2 Misure effettuate

Con la colonna Symmetry sono stati determinati i fattori di ritenzione (k') e la selettività (α) del Fenolo e dell'Alcool Benzilico lavorando a diverse composizioni di fasi mobili.

Il tempo di switch a cui la valvola operava (Δt_{min}) è stato calcolato in modo da non avere sovrapposizione dei picchi, utilizzando la seguente formula:

$$\Delta t_{min} = (t_{R,last} - t_{R,first}) + 4\sigma R_s \quad (3.5)$$

dove $t_{R,first}$ e $t_{R,last}$ sono i tempi di ritenzione del primo e del secondo analita eluiti dalla colonna, rispettivamente Alcool Benzilico e Fenolo, σ è la deviazione standard del picco e

Symmetry, loop 20 μ L, 1mL/min				
% AcN	T_0	k' Al. Benzilico	k' Fenolo	α
20	1.825	1.43	2.07	1.44
30	1.793	0.72	1.05	1.46
40	1.773	0.43	0.61	1.42
50	1.754	0.29	0.38	1.31
60	1.776	0.19	0.24	1.26
70	1.785	0.13	0.16	1.23

Tabella 3.1: Misure k' a diverse composizioni di fasi mobili. Le soluzioni sono preparate nelle fasi mobili. Arrangiamento:loop20 μ L

XTerra, loop 20 μ L, 1mL/min			
% AcN	k' Al. Benzilico	k' Fenolo	R_s
20	0.54	0.68	1.13
30	0.35	0.43	0.71
40	0.28	0.32	0.50
50	0.24	0.27	0.41
60	0.22	0.23	0.20
70	0.21	0.22	0.20

Tabella 3.2: Misure k' a diverse composizioni di fasi mobili sulla seconda dimensione.

R_s è la risoluzione tra due picchi successivi, definita in cromatografia come tra il rapporto della differenza dei tempi di ritenzione di due picchi successivi e quattro volte la deviazione standard. Con le condizioni illustrate nella tabella 3.2 si è scelto di lavorare sulla seconda direzione all'unica condizione che fornisse una risoluzione adatta, con il 20% AcN ($\phi=0.2$, $R_s=1.13$). In queste condizioni il Δt_{min} risultava dover essere maggiore o uguale a 0.26 minuti, ottenendo così per i picchi campionati un valore di deviazione standard (σ) pari a 0.031 min.

La deconvoluzione dei cromatogrammi campionati è stata effettuata considerando

che in condizioni lineari la concentrazione di un componente (C) risulta direttamente proporzionale all'assorbanza, Abs (legge di Lambert-Beer):

$$Abs = kC \quad (3.6)$$

in cui k rappresenta la costante di proporzionalità che si può ottenere dalla costruzione della curva di calibrazione del componente. Considerando un picco in uscita dalla colonna cromatografica, dal suo valore di assorbanza si può risalire alla sua concentrazione, tramite il seguente rapporto:

$$m = \int \frac{Abs(V)dV}{k} \quad (3.7)$$

dove m è la massa del picco considerato e $Abs(V)$ è il valore di assorbanza fornito dal detector e relativo al volume di ritenzione del picco, calcolato cioè considerando il tempo di ritenzione e la velocità di flusso. Considerando lo schema del processo si intuisce che per ottenere la concentrazione del picco si deve far riferimento al loop posizionato sulla valvola 10-vie (V_{loop-2}), e nel nostro caso, abbiamo utilizzato il seguente passaggio:

$$C = \frac{\int \frac{Abs(V)dV}{k}}{V_{loop-2}} = \frac{m}{V_{loop-2}} \quad (3.8)$$

Calcolando le varie concentrazioni ottenute da tutti i picchi campionati sulla seconda direzione si può risalire alla concentrazione della soluzione iniziale. Questo passaggio risulta più difficoltoso in condizioni di gradiente, rispetto alle condizioni isocratiche in quanto si ha una compressione dei picchi (come riportato in Figura 3.8). Si può infatti notare come il numero dei picchi campionati sia ridotto nel caso in cui venga applicato un gradiente rispetto al campionamento in isocratica. La compressione generata dal gradiente è proporzionale al valore di b_S , infatti, aumentando questa pendenza, aumenta anche la compressibilità [48].

Nella Tabella 3.3 sono riportati i valori di concentrazioni calcolati, quelli reali e i relativi errori di alcune soluzioni di Al. Benzilico e Fenolo campionate con diversi programmi di gradiente. Per ogni esperimento sono riportati i valori di concentrazione di Acetonitrile iniziale e finale (ϕ), il tempo durante il quale è stato applicato il gradiente (t_G) e il valore della pendenza dell'isoterma (b_S).

Soluzione 1 (6.79g/L Al. Benzilico e 20.19g/L Fenolo), Loop I^a d 100 μ L, II^a d 20 μ L								
Prima Dimensione			Al Benzilico			Fenolo		
ϕ	t_G	b_S	Cal (mg)	Inj (mg)	E%	Cal (mg)	Inj (mg)	E%
0.2-0.7	20	1	0.660	0.679	3	2.10	2.019	4
0.2-0.7	30	0.65	0.636	0.679	6	2.036	2.019	1
0.2-0.7	50	0.4	0.670	0.679	1	2.12	2.019	5
Soluzione 2 (20.9g/L Al. Benzilico 13.52g/L Fenolo), Loop I^a d 100 μ L, II^a d 20 μ L								
Prima Dimensione			Al. Benzilico			Fenolo		
ϕ	t_G	b_S	Cal (mg)	Inj (mg)	E%	Cal (mg)	Inj (mg)	E%
0.1-0.5	70	0.2	2.03	2.09	3	1.392	1.352	3
0.2-0.5	50	0.2	2.05	2.09	-2	1.338	1.352	-1
0.2-0.7	50	0.4	2.13	2.09	2	1.379	1.352	2
Soluzione 3(6.79g/L Al. Benzilico 15.01g/L Fenolo), Loop I^a d 100 μ L, II^a d 20 μ L								
Prima Dimensione			Al. Benzilico			Fenolo		
ϕ	t_G	b_S	Cal (mg)	Inj (mg)	E%	Cal (mg)	Inj (mg)	E%
0.2-0.7	20	1	0.625	0.679	-8	1.411	1.501	-6
0.2-0.7	30	0.65	0.658	0.679	-3	1.558	1.501	4
0.2-0.7	50	0.4	0.645	0.679	-5	1.561	1.501	4

Tabella 3.3: Calcolo errore percentuale (E%) tra masse calcolate (Cal) e iniettate (Inj) per diverse soluzioni binarie con varie condizioni di gradiente.

Nelle Figure 3.9, 3.11 e 3.13 sono riportati i profili campionati, e per due casi anche i profili in overloading corrispondenti, per le tre soluzioni i cui dati sono riportati nella Tabella 3.3. In base ai picchi campionati sulla prima direzione sono stati ricostruiti i profili di concentrazione per ogni componente e sono riportati nelle figure 3.10, 3.12 e 3.14. Per calcolare il valore della massa di ogni componente i vari punti ottenuti da ogni picco sono stati fittati con una spline cubica ed in seguito è stato calcolato l'integrale.

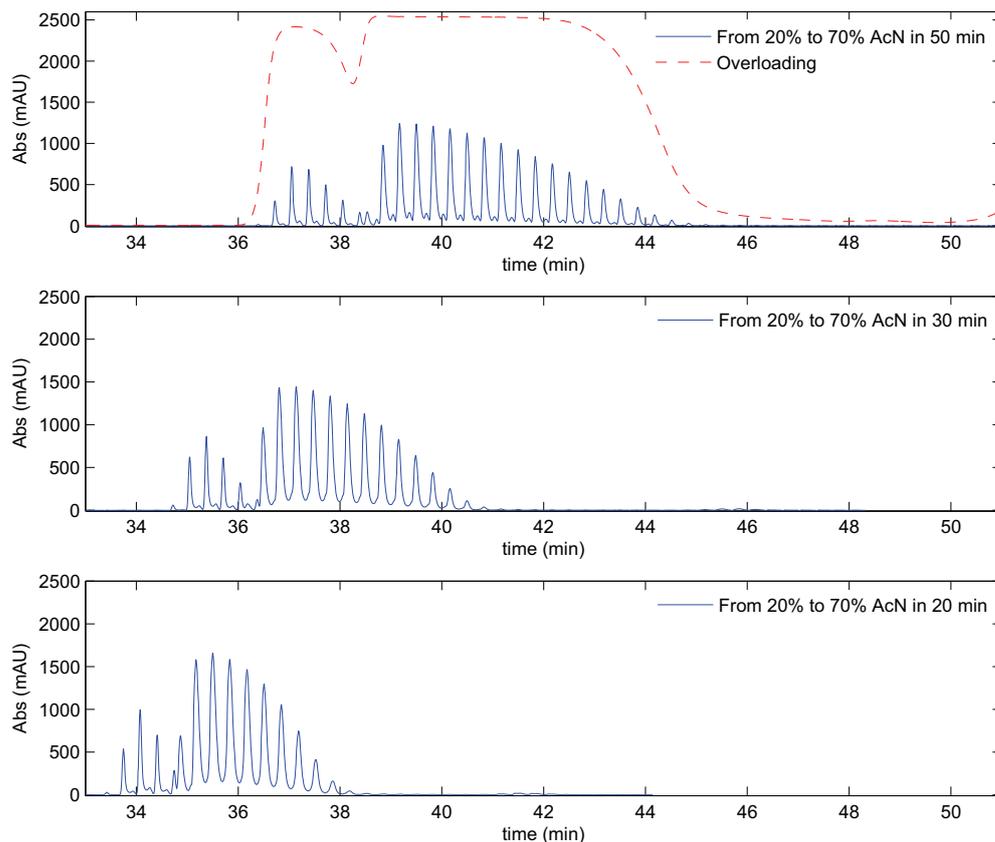


Figura 3.9: Gradiente dal 20% al 70% di AcN, Soluzione 1

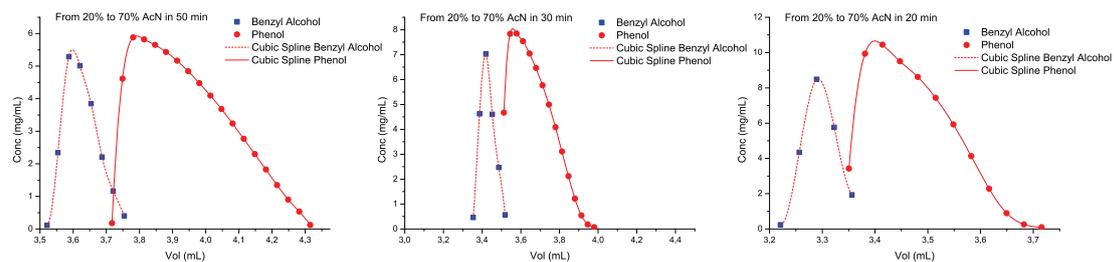


Figura 3.10: Profili di concentrazione calcolati per la soluzione 1, gradienti da 20 a 70% di AcN in 50 min, 30 min e 20 min

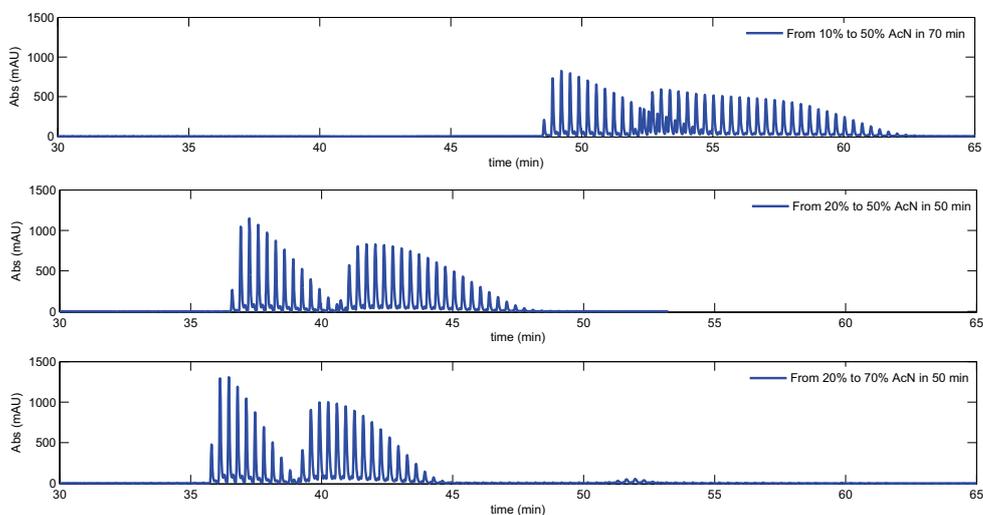


Figura 3.11: Vari gradienti, Soluzione 2

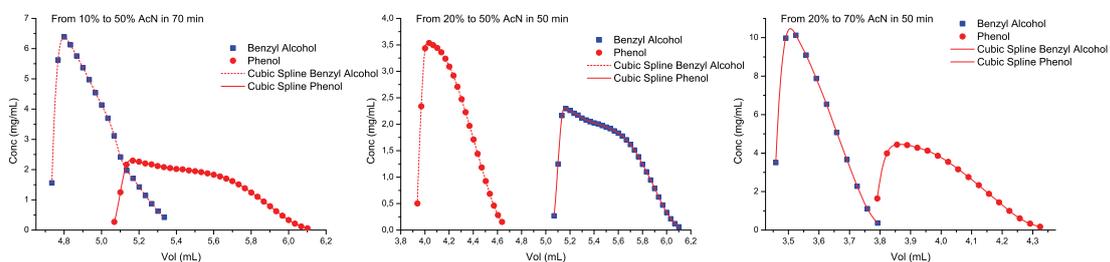


Figura 3.12: Profili di concentrazione calcolati per la soluzione 2 nei diversi tipi di gradiente applicati

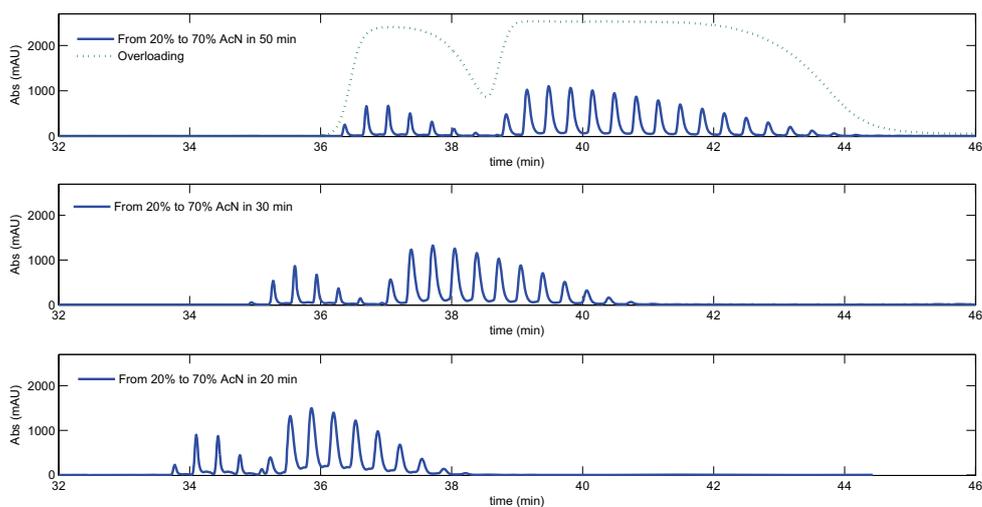


Figura 3.13: Gradiente dal 20% al 70% di AcN, Soluzione 3

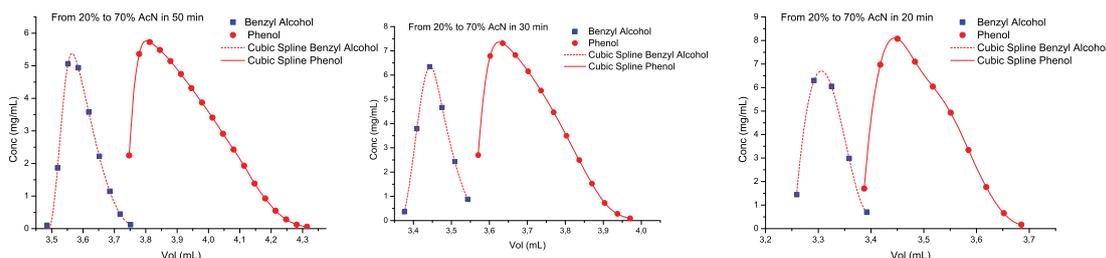


Figura 3.14: Profili di concentrazione calcolati per la soluzione 3, gradiente dal 20 al 70% di AcN in 50 min, 30 min e 20 min

Aumentando il fattore b_S si ottengono gradienti con pendenze più elevate, questi portano ad una compressione maggiore sui due composti iniettati. Nella ricostruzione dei profili di concentrazione la maggior compressione porta a un numero minore di picchi campionati sulla seconda dimensione, per cui la ricostruzione dei picchi in overloading presenterà un'accuratezza minore, un'interpolazione (nel nostro caso con una spline di tipo cubica) si renderà necessaria prima di effettuare l'integrazione. Nei casi studiati, con un programma di gradiente con un basso valore di b_S , la ricostruzione del profilo ha presentato un errore percentuale inferiore al 3%, come riportato nella tabella 3.3. Nei casi in cui b_S presentava valori maggiori, ad esempio 0.65, il numero di picchi campionati

per il primo componente era pari a 7 e nel caso di b_S paria a 1 di 4-5 picchi, il che va a influire negativamente sull'accuratezza. Per quanto riguarda il secondo campione eluito, il Fenolo, il numero di picchi campionati è sempre di almeno dieci punti, e l'errore relativo presentava sempre valori inferiori al 10%. Tramite questo metodo, da una semplice iniezione, attraverso l'uso di metodi inversi è possibile determinare anche diversi punti appartenenti ad un'isoterma di adsorbimento, riducendo il tempo, il materiale e i costi delle classiche misurazioni, rispetto ad esempio ad una classica analisi frontatale.

Con il sistema messo appunto è stato possibile ricostruire il profilo di concentrazione dei singoli componenti della miscela, Alcool Benzilico e Fenolo, senza avvalersi della calibrazione del detector nel tratto non lineare. Si è determinato come la pendenza del gradiente influisca sulla compressione dei picchi e sul loro campionamento al fine di ricostruire il loro profilo. Inoltre, con questo procedimento, è possibile determinare le isoterme di adsorbimento di singolo componente in maniera veloce e funzionale.

3.3 Determinazione di costanti di binding in sistemi di bioaffinità

In applicazioni cromatografiche di bioaffinità, la fase adsorbente è caratterizzata dalla presenza di molecole con attività biologica (farmaci, peptidi, proteine, ecc.) legate a un supporto inerte (es. silice o polistirene). Mediante studi cromatografici non lineari (determinazione delle isoterme di adsorbimento) è possibile determinare le costanti di binding di molecole quali farmaci, proteine, peptidi, ecc. su queste fasi [57]. Il lavoro svolto ha riguardato lo studio del binding di dipeptidi (in particolare gli enantiomeri D-Ala-D-Ala e L-Ala-L-Ala) su antibiotici macrociclici (teicoplanina). Lo studio delle interazioni Ala-Ala con Teicoplanina è importante perché il meccanismo di azione di questo antibiotico (e della classe degli antibiotici macrociclici) è proprio basato sul riconoscimento del terminale D-Ala-D-Ala [58]. Diverse misure di isoterme di adsorbimento di dipeptidi sono state eseguite su fasi stazionarie chirali, costituite da antibiotici di tipo macrociclico. La fase stazionaria è composta da un glicopeptide macrociclico (teicoplanina) legato al gel di silice con legami covalenti. I glicopeptidi sono strutture molto usate negli ultimi anni come selettori chirali per la cromatografia liquida. Possiedono la caratteristica di poter essere usati in condizioni molto diverse di fase mobile (normale, inversa o polar organic mode). I composti macrociclici hanno mostrato un'eccellente abilità di separare differenti classi di miscele racemiche [59] (come ad esempio amminoacidi non derivatizzati, amminoacidi, composti farmaceutici acidi o basici), e risultano essere particolarmente adatti per la cromatografia preparativa data la loro alta capacità di carica. Il legame tra un antibiotico macrociclico di tipo glicopeptidico come la Teicoplanina e alcuni dipeptidi e amminoacidi è stato studiato in condizioni non lineari. La fase stazionaria basata sulla Teicoplanina, progettata specificatamente per avere la massima selettività e loading, riducendo le interazioni non specifiche, è stata impaccata in colonne di tipo microbore (diametro interno di circa 1 mm).

3.3.1 Determinazione del binding

Per lo studio dei meccanismi di ritenzione tra substrati e antibiotici macrociclici non basta la misura dei fattori di ritenzione in condizioni lineari, perché non permettono di separare le interazioni selettive da quelle non selettive, infatti includono tutti i tipi di interazione tra gli analiti e la fase stazionaria. Delle misure cromatografiche effettuate in condizioni non lineari permettono invece questa discriminazione. Utilizzando l'Analisi Frontale, iniettando così grandi quantità di analita, si può avere una misura diretta della costante di equilibrio tra le molecole di analita e la fase stazionaria e si può inoltre determinare l'energia di interazione. I dati dell'isoterma forniscono l'energia di binding dalla distribuzione dell'energia di adsorbimento. Con l'analisi frontale si può studiare un ampio range di concentrazione, e il tempo di ritenzione delle curve di breakthrough è indipendente dalla concentrazione del substrato [60]. Considerando indipendenti i siti attivi presenti sulla fase stazionaria, l'assenza di interazioni da parte dell'analita con altri siti e l'assenza di competizione per l'adsorbimento, si può utilizzare il modello di Langmuir per descrivere il binding [61–64], modello detto di Michaelis-Menten dai biochimici [65]. L'equilibrio può essere rappresentato nel seguente modo:



dove l'analita è rappresentato da A , il ligando presente sul sito da L e il soluto legato al sito AL . Come per le classiche reazioni chimiche, la costante di equilibrio per la reazione 3.9, può essere espressa nel seguente modo:

$$K_L = \frac{[AL]}{[A][L]} \quad (3.10)$$

dove le parentesi quadre indicano le concentrazioni molari dei tre componenti. In questo caso la concentrazione di $[AL]$ può anche essere descritta dal prodotto tra la densità di particelle (ρ_p) e la concentrazione media di analita A adsorbito (q_A). La concentrazione di ligando libero $[L]$ può essere espressa come la differenza tra il numero massimo di questi siti accessibili ($\rho_p q_S$), dove q_S è la capacità di saturazione della colonna, e il numero di siti occupati ($\rho_p(q_S - q_A)$). L'equazione 3.10 può essere perciò riscritta come:

$$q_A = \frac{q_S K_L c_A}{1 + K_L c_A} \quad (3.11)$$

dove c_A descrive la concentrazione dell'analita nella fase mobile. Questa equazione è l'equazione di Langmuir (Eq. 2.32) che descrive l'adsorbimento di un monostato di analita su una fase adsorbente con siti della stessa energia. Le interazioni che si possono formare tra gli enantiomeri e la fase stazionaria possono essere di vari tipi: Van der Waals, forze ioniche, legami idrogeno, effetto sterico ed altre ancora. In questo caso il modello di isoterma di Toth (Eq. 2.34) risulta essere il più adatto per descrivere questo particolare adsorbimento che coinvolge interazioni di vario tipo:

$$q_A = \frac{q_S K_T c_A}{[1 + (K_T c_A)^r]^{1/r}} \quad (3.12)$$

dove r è il parametro che descrive l'eterogeneità della fase stazionaria e, se il suo valore risulta essere paria a 1, l'isoterma si riduce all'isoterma di Langmuir. Nel modello di Toth la costante di equilibrio è data da K_T^r . Tenendo in considerazione questo tipo di isoterma la funzione che descrive la distribuzione di energia ($F(\varepsilon)$) viene così descritta [66]:

$$F(\varepsilon) = \frac{1}{\pi k_B T} Y(\varepsilon)^{1/r} \sin \left[\frac{1}{r} \arcsin \left[\sin(\pi r) \frac{k}{k_m} Y(\varepsilon) \right] \right] \quad (3.13)$$

dove k_B è la costante di Boltzmann, T la temperatura assoluta, k è la costante di equilibrio e ε l'entalpia di adsorbimento. La funzione Y è così definita:

$$Y = \sqrt{\left(\frac{k}{k_m} \right)^{2r} + 2 \cos(\pi r) \left(\frac{k}{k_m} \right)^r + 1} \quad (3.14)$$

Queste espressioni sono valide per l'adsorbimento gas-solido. L'entalpia di adsorbimento e la costante di equilibrio sono correlate dalla seguente espressione [67]:

$$k = k_0 \exp \left(\frac{\varepsilon}{RT} \right) \quad (3.15)$$

dove k_0 è un fattore pre-esponenziale (costante a un valore di T costante). k_m è il valore della costante di equilibrio che corrisponde al valore di entalpia di adsorbimento pari a ε_m :

$$k_m = k_0 \exp \left(\frac{\varepsilon_m}{RT} \right) \quad (3.16)$$

Applicando questo modello all'interfaccia liquido-solido, come nel nostro caso, il fattore dell'entalpia di adsorbimento viene sostituito dall'energia libera di adsorbimento di Gibbs

(ΔG):

$$k = \exp\left(-\frac{\Delta G}{RT}\right) \quad (3.17)$$

Utilizzando l'Analisi Frontale, per ogni curva di breakthrough si viene a determinare un corrispondente valore di concentrazione del soluto in fase stazionaria con l'equazione 2.37. Considerando l'isoterma di Toth (Equazione 3.12) i vari punti dell'Analisi Frontale vengono collegati alle proprietà termodinamiche del sistema dalla seguente espressione:

$$V_b - V_0 = \frac{q_s K_T V_{ads}}{[1 + (K_T c_A)^r]^{1/r}} \quad (3.18)$$

3.3.2 Caratteristiche colonna Teicoplanina

La Teicoplanina è un antibiotico di tipo macrociclico ($C_{88}H_{97}Cl_2N_9O_3$, PM 1877.56). Questa molecola è stata legata a delle particelle di un gel di silice attivato e sottoposto a reazione di endcapping. L'efficienza della colonna è stata testata con iniezioni di composti come benzene, toluene e naftalene, mentre le sue capacità enantioselettive in quanto fase chirale sono state testate con l'iniezione di amminoacidi, infatti questa molecola dalla struttura a basket [68] presenta diversi centri chirali sulla sua superficie. La colonna di tipo microbore, le cui dimensioni sono di 150 x 3.2mm, è stata impaccata con Teicoplanina legata a particelle di silice di diametro di $5\mu m$, con un diametro nei pori di 100\AA e un'area superficiale di $455m^2/g$. Il volume morto della colonna (V_0) è stato determinato tramite misure di picnometria e calcolato con la formula riportata dall'equazione 3.1, ed è risultato essere pari a 0.807mL. Tramite un serie di iniezioni di polistireni a peso molecolare noto sono state effettuate delle misure per determinare la porosità della colonna (inverse size exclusion chromatography - ISEC). Mettendo in grafico il volume di ritenzione dei polistireni iniettati con tetraidrofurano come fase mobile, contro il loro peso molecolare elevato a $1/3$, si ottiene un grafico da cui è possibile estrapolare, considerando un PM pari a zero, il volume esterno (V_e) alle particelle porose, nel nostro caso pari a 0.500mL. La porosità esterna della colonna (ε_e) è determinata dal rapporto tra V_e e V_{col} , e nel nostro caso ha un valore di 0.471. Dalla differenza tra l'hold up volume e il volume esterno si può determinare il volume interno (V_i). Da questo parametro è possibile poi calcolare il valore di porosità interna (ε_i), pari a 0.255.

3.3.3 Interpretazione dei dati

Le misurazioni sono state eseguite con un micro HPLC tipo Agilent 1100, utilizzando come detector un rivelatore tipo Diode Array con una cella di $500nL$. Per ridurre il volume extracolonna sono state impiegate connessioni di silice con diametro di $150\mu m$. Le isoterme di adsorbimento degli enantiomeri della Prolina (L,D-Pro), Alanina (L,D-Ala), e del dimero Alanina-Alanina (Ala-Ala) sono state misurate con l'analisi frontale sulla colonna di Teicoplanina. La fase mobile utilizzata è una miscela al 60% di metanolo e 40% di un tampone 20mM di ammonio acetato a pH 7. La colonna era mantenuta ad una temperatura di $25.0 \pm 0.1^\circ C$. La velocità del flusso era di $500\mu L/min$ ed i cromatogrammi sono stati studiati ad una lunghezza d'onda di 214nm. Utilizzando il modello tipo Langmuir (Equazione 3.11), le energie di interazione dei vari siti attivi presenti sulla superficie, selettivi e non selettivi, vengono considerati molto simili. Una sola costante di binding può così essere definita per caratterizzare i siti di adsorbimento sulla superficie. Utilizzando il modello di Toth (Equazione 3.12) viene invece considerato un modello di adsorbimento eterogeneo. Nelle Figure 3.15 - 3.17 sono riportati i punti ottenuti dall'analisi frontale degli enantiomeri di Prolina (Pro), Alanina (Ala) e del dimero Alanina-Alanina (Ala-Ala). Il modello di Langmuir fitta i dati molto bene per quanto riguarda la L-Pro, D-Ala, L-Ala e L-Ala-L-Ala, mentre non è adatto per la D-Pro e la D-Ala-D-Ala, per i quali un adsorbimento di tipo omogeneo non rappresenta adeguatamente il processo di binding. Il modello Toth invece fitta abbastanza bene i vari peptidi, esclusa la L-Ala. In questo caso infatti il parametro r del modello, che rappresenta le eterogeneità della superficie, assume un valore maggiore di 1, cosa che non ha significato fisico in quanto il suo valore può variare da 0 a 1. Nella Tabella 3.4 sono riportati i valori della capacità di saturazione q_s ($\mu mol/g$), la costante di equilibrio per il caso Langmuir K_L e quella per il caso Toth K_T^r entrambe espresse in $mL/\mu mol$, il valore di r e per entrambi i fitting il valore della somma dei quadrati residui (SSR).

Dalle costanti di binding ricavate dai fitting si può notare che per la D-Ala-D-Ala questa assume un valore molto maggiore rispetto a tutte le altre, infatti lavorando con antibiotici macrociclici come la Teicoplanina, questo dimero è indicato come target [69].

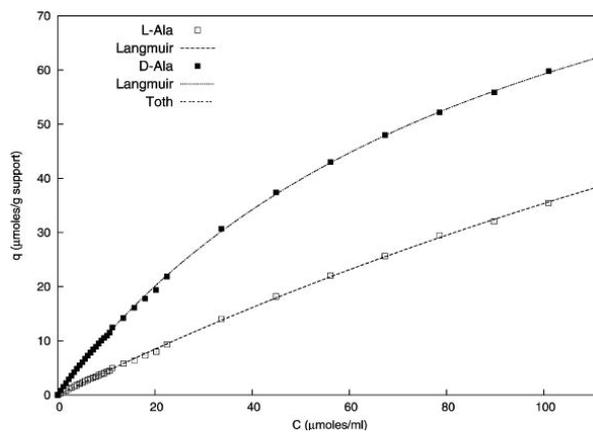


Figura 3.15: Enantiomeri Alanina

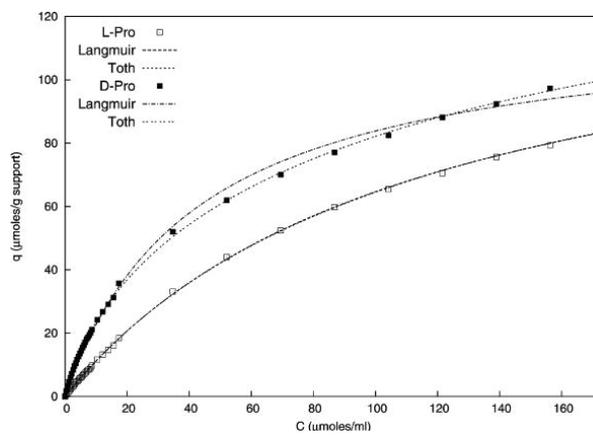


Figura 3.16: Enantiomeri Prolina

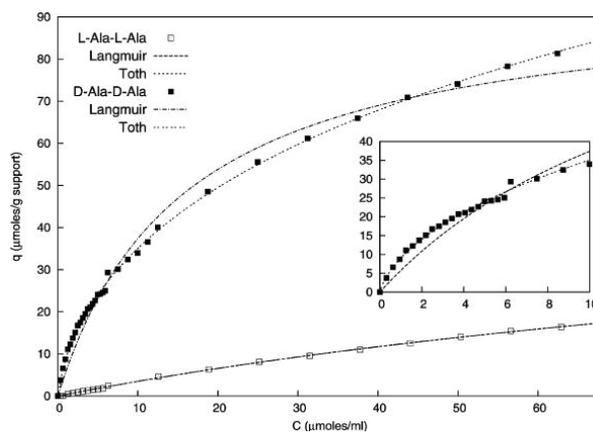


Figura 3.17: Enantiomeri del dimero Alanina-Alanina

Composti	Langmuir			Toth			
	q_S	K_L	SSR	q_S	K_T^r	r	SSR
D-Pro	119±2	0.023±0.001	3.617	204±10	0.126±0.009	0.55±0.02	0.312
L-Pro	138±1	0.0088±0.0001	0.187	144±6	0.011±0.002	0.95±0.04	0.187
D-Ala	115±1	0.0105±0.0001	0.078	117±6	0.011±0.002	0.98±0.04	0.081
L-Ala	171±7	0.0026±0.0001	0.042	179±7	0.005±0.002	1.36±0.18	0.037
D-Ala-D-Ala	96±2	0.064±0.004	7.072	656±191	0.52±0.04	0.25±0.03	0.446
L-Ala-L-Ala	56±3	0.0066±0.0004	0.022	65±31	0.01±0.01	0.91±0.23	0.023

Tabella 3.4: Parametri delle isoterme calcolate con fitting non lineare per gli enantiomeri di Pro, Ala e Ala-Ala

Dai valori dei fattori di saturazione calcolati è possibile determinare che per ogni molecola di antibiotico legata al supporto si hanno 4 molecole di dimero D-Ala-D-Ala, 1.2 molecole di D-Pro, 0.9 molecole di L-Pro e 0.7 molecole di D-ALa. Questi valori differiscono da quelli calcolati con misure di soluzioni con la spettroscopia NMR, che forniscono un rapporto antibiotico-dimero 1:1 [70], in quanto vengono considerate condizioni completamente diverse per quanto riguarda pH, forza ionica e arrangiamento spaziale. Sono stati misurati i valori dei fattori di ritenzione calcolati direttamente dal cromatogramma con la classica formula:

$$k' = \frac{V_R - V_0}{V_0} \quad (3.19)$$

dove V_R è il volume di ritenzione dell'analita iniettato in condizioni lineare e V_0 è l'hold up volume della colonna. Nella tabella 3.5 sono riportati i valori dei fattori di ritenzione ricavati dal cromatogramma e quelli ricavati dalla pendenza iniziale dell'isoterme ($k' = aF$), dove a è la pendenza dell'isoterma in condizioni di diluizione infinita. Nel caso dell' L-Ala il fattore di ritenzione non è stato ricavato dal fitting Toth in quanto questo presentava un valore di r maggiore di 1, dato non accettabile. Confrontando i vari valori di k' si può facilmente vedere come quelli riguardanti la D-Pro e la D-Ala-D-Ala presentino i valori maggiori. I valori ricavati dall'isoterma di Toth si avvicinano maggiormente a quelli ricavati dal cromatogramma, in quanto il modello di Langmuir non riesce a fittare in

Composto	k'_{ch}	k'_L	k'_T	α_L	α_T
D-Pro	2.3	1.34	2.29	2	3.8
L-Pro	0.6	0.59	0.60		
D-Ala	0.6	0.59	0.59	3	
L-Ala	0.2	0.22	n.a.		
D-Ala-D-Ala	23.8	3.03	23.5	17	119
L-Ala-L-Ala	0.2	0.18	0.19		

Tabella 3.5: Fattori di ritenzione calcolati dal cromatogramma (k'_{ch}), dall'isoterma Langmuir (k'_L) e dall'isoterma Toth (k'_T), e fattori di separazione (α) ricavati dai valori di k' .

maniera opportuna la prima parte dell'isoterma. Con valori di k' inferiori si ha un'isoterma con una minor curvatura, tra i due modelli, Langmuir e Toth, non si ha una differenza significativa, ci si può attenere al modello più semplice tra i due. Nel caso della D-Ala-D-Ala si ottiene un fattore di separazione (α) molto maggiore rispetto a tutti gli altri casi considerati, questo conferma il comportamento della Teicoplanina come filtro molecolare per gli enantiomeri di questo dipeptide.

I dati sperimentali riguardanti il binding sono stati interpretati considerando un modello omogeneo e prendendo in considerazione un modello eterogeneo che tiene conto della dispersione della distribuzione dell'energia di adsorbimento (AED). Il valore della costante di binding è stato ottenuto mediante l'analisi delle isoterme di adsorbimento. Oltre a confermare l'importanza della frazione terminale D-Ala-D-Ala nel riconoscimento molecolare tra il dipeptide e l'antibiotico macrociclico della Teicoplanina (si è riscontrato che la Teicoplanina si comporta come un filtro molecolare verso gli enantiomeri di Ala-Ala), questo studio dimostra che un modello eterogeneo di adsorbimento è necessario per la corretta interpretazione dei dati di binding [58].

3.4 Studio degli equilibri di adsorbimento dell'insulina in fase inversa

Lo studio del comportamento e delle interazioni di una proteina in cromatografia di fase inversa può coinvolgere diversi fattori che riguardano la struttura della fase stazionaria, la possibile solvatazione delle molecole del soluto, o addirittura la trasformazione della sua struttura terziaria (folding e defolding) [71–73]. Il comportamento della proteina dell'insulina è stato studiato con diverse composizioni di fasi mobili su fase stazionaria di catene di carbonio di diciotto unità con alta porosità (300°A). Colonne con alta porosità vengono utilizzate in genere per effettuare studi su molecole di grandi dimensioni (come ad esempio proteine e peptidi) per avere maggior ritenzione. Le isoterme di adsorbimento sono state misurate nelle diverse composizioni di fase mobile (acetonitrile-acqua ed acido trifluoroacetico al 0.1%). I dati per le isoterme sono stati acquisiti tramite l'analisi frontale, ottenendo i cosiddetti profili di breakthrough, lavorando in condizioni non lineari, e da questi profili si sono potuti calcolare i valori dell'isoterma. Questi valori sono stati fittati con diversi modelli (Langmuir, Bi-Langmuir e Toth) al fine di trovare il modello migliore che rappresentasse l'isoterma. Ulteriori misure di Size Exclusion Chromatography (ISEC) sono state eseguite con polistireni di diversa grandezza (500Da-3040KDa), per caratterizzare ulteriormente la fase stazionaria e determinarne la porosità. Dallo studio dei profili ottenuti con l'analisi frontale si è determinata la presenza di agglomerati della proteina in soluzione. Inizialmente sono state eseguite delle misure di dicroismo circolare, per lo studio delle modifiche strutturali della proteina al variare della composizione della fase mobile, ma purtroppo da queste non si è riusciti a risolvere il problema. La presenza di questi agglomerati, scarsamente documentata in letteratura, è stata infine confermata da ulteriori misure con l'utilizzo di un HPLC-MS. Campionando in diverse frazioni il picco iniettato in condizioni di overloading, ed iniettando queste frazioni direttamente nello spettrometro di massa si sono potuti vedere i picchi relativi appunto ai dimeri che sono venuti a formarsi in soluzione.

3.4.1 Insulina: forma e caratteristiche

L'insulina è un ormone sintetizzato nel pancreas, che regola in passaggio del glucosio dal torrente sanguigno all'interno della cellula. Reagisce con un recettore presente sulla membrana cellulare per la regolazione del glucosio ematico. Il punto isoelettrico dell'insulina cristallina in buffer acetato M/30 varia tra i valori di pH 5.3 e 5.35 [74]. L'insulina ($C_{254}H_{377}N_{65}O_{76}S_6$) è relativamente insolubile in ambiente acquoso tra pH 4 e 7 [75]. Questo polipeptide è costituito da 52 amminoacidi dislocati in due catene distinte e unite mediante ponti disolfuro. Il recettore con cui interagisce è di tipo tirosin-chinasi, che possiede due subunità alfa e due beta. Il monomero dell'insulina (come riportato nello schema in Fig.3.18), ha un peso molecolare di 5808Da, e consiste in due catene: la catena A con 21 amminoacidi e la catena B con 30 amminoacidi [76]. La concentrazione di acido trifluoroacetico utilizzata nelle fase mobile (0.1%) porta ad avere quattro cariche positive sulla catena B [77]. La proteina ha una struttura compatta globulare, con una parte interna idrofobica, mentre i residui presenti in superficie sono principalmente polari. Le due catene sono collegate tramite due ponti di-solfuro. Un ulteriore ponte di-solfuro collega due parti della catena A [78]. In ogni catena sono presenti due gruppi caricati negativamente, due glutammati, e nella catena B ci sono quattro amminoacidi con gruppi positivi: due istidine, un'arginina ed una lisina.

Le molecole dell'insulina in soluzione hanno la tendenza a formare dei dimeri [73], infatti ad elevate concentrazioni con un valore di pH acido o neutro l'insulina è presente in soluzione come dimero [79, 80]. L'insulina è relativamente insolubile in soluzioni acquose nel range di pH tra 4 e 7 [75]. In genere l'adsorbimento presenta un massimo nel punto isoelettrico della proteina. L'adsorbimento delle proteine è un processo guidato dall'entropia, dato che diverse molecole di solvente si distaccano dalla fase stazionaria per ogni molecola di proteina che viene adsorbita [81]. Lavorando in fase inversa, le principali interazioni sono di tipo idrofobico, interazioni dipolari, π - π e π -dipolo, e interazioni di tipo legame idrogeno. L'ultima probabilmente rappresenta il fattore di maggiore importanza per i processi di ripiegamento della proteina (folding). Le interazioni con solventi acquosi in fase mobile portano a un cambiamento negativo dell'entropia, perché le molecole di ac-

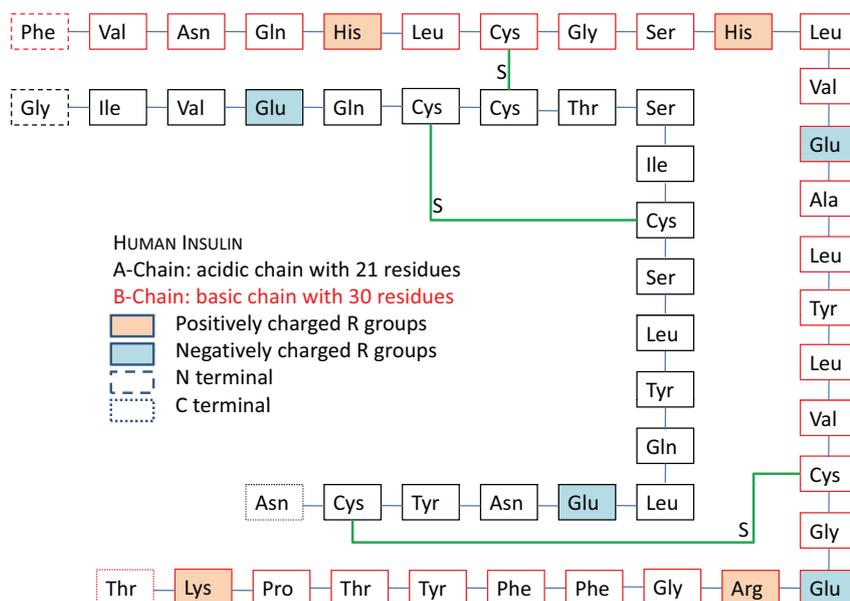


Figura 3.18: Struttura del monomero dell'Insulina

qua, in prossimità della buca del solvente dove c'è la proteina, aumentano di numero. Le interazioni con la fase stazionaria in cromatografia in fase inversa aumentano l'entropia. Lavorando a circa 25°C il processo diventa completamente guidato dall'entropia([82], capitolo 5).

3.4.2 Scelta delle condizioni sperimentali

La misura di isoterme risulta essere molto utile al fine di determinare la quantità di componente adsorbito sulla fase stazionaria all'equilibrio con una quantità nota in fase mobile. Le condizioni da noi utilizzate sono state lavorando in fase inversa (fase stazionaria meno polare della fase mobile) in condizioni isocratiche. La fase stazionaria è una colonna con supporto di silice derivatizzata con catene alchiliche di 8 unità di lunghezza (C8). Alla fase mobile è stato aggiunto l'acido trifluoroacetico (TFA) con una concentrazione pari a 0.1% in volume (13mM) per la sua proprietà di formazione di coppie ioniche [73,83].

Lavorando a bassi valori di pH con le proteine basiche non si ha codatura del picco([82], capitolo 5). In queste condizioni gli anioni idrofobici TFA^- possono neutralizzare le cariche positive presenti nei gruppi alchilici della catena B, aumentando così il carattere idrofobico della proteina. Se sulla superficie adsorbente sono presenti gruppi silanolicci liberi, questi agiscono come acidi deboli e sono ionizzati ad un valore di pH inferiore a 3.5-4 [84], per cui nelle condizioni di lavoro rimangono protonati, e così anche i gruppi carbossilici della proteina, e i controioni anionici possono interagire con i residui basici protonati. In questo modo non si formano interazioni tra i gruppi idrofobici presenti sulla fase stazionaria ed i gruppi positivi della proteina [77].

3.4.3 Ritenzione dell'Insulina

Per il nostro lavoro sono state effettuate diverse iniezioni di insulina in varie condizioni di fase mobile (AcN / mQ / 0.1%TFA). I dati sono riportati nella Tabella 3.6. Il loop utilizzato era di $5\mu L$ e la velocità di flusso di $50\mu L/min$. Per piccoli cambiamenti di AcN, la ritenzione mostra grandi differenze e dal grafico appare la tipica forma di una "U" inclinata in dipendenza della frazione del solvente organico, un comportamento tipico per le proteine in cromatografia di fase inversa. Il grafico della ritenzione contro la composizione del solvente mostra un punto di minimo [72]. Questo può essere attribuito al fatto che ad elevate concentrazioni di modificatore organico (AcN) le interazioni in fase inversa non riescono più ad avvenire e si deve considerare un'ulteriore modello di interazioni [83]. Per concentrazioni inferiori al 27% di AcN l'eluizione richiede tempi lunghi, aumentando invece la concentrazione di AcN il processo di eluizione diventa più veloce. In condizioni di 0.1%TFA il valore del k_D , coefficiente del distribuzione, divente indipendente dall grandezza della proteina [85]. La Figura 3.19 mostra il comportamento dell'insulina riportando $\log k'$ vs %AcN. I dati sono stati fittati con un fitting di tipo cubico, con un coefficiente di determinazione (R^2) pari a 0.9967.

%mQ	% AcN	k'	$\log k'$
73	27	6.72	0.83
72	28	4.48	0.65
71	29	2.96	0.47
70	30	1.99	0.30
69	31	1.34	0.13
68	32	0.79	-0.10
67	33	0.65	-0.19
65	35	0.39	-0.41
62	38	0.25	-0.60
60	40	0.14	-0.86
55	45	0.10	-0.98
50	50	0.08	-1.08

Tabella 3.6: Comportamento dell' insulina a diverse composizioni di fase mobile, Colona: C8 RP300, 300Å, 150x1mm, 5µm, MP:AcN/mQ/0.1%TFA, Flusso: 5µL/min, Loop: 5µL. I valori di k' sono ottenuti con: $(T_R - T_0)/(T_0 - T_{ex})$, e in questo caso il valore di T_{ex} è di 0.28min.

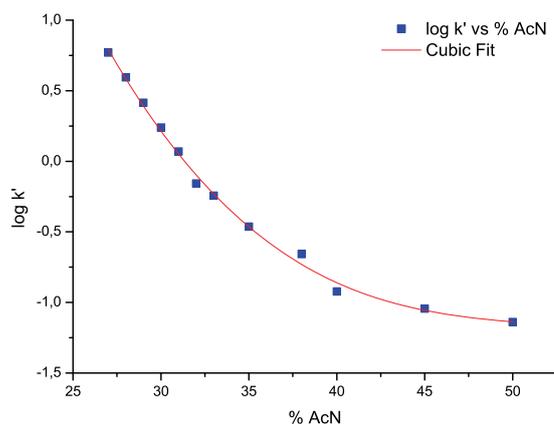


Figura 3.19: Effetto della composizione del solvente sulla ritenzione dell'insulina, fitting con modello lineare e cubico (vedi testo per dettagli), Colonna: C8 RP300, 300Å, 150x1mm, 5µm, MP:AcN/mQ/0.1%TFA, Flusso: 5µL/min, Loop: 5µL

3.4.4 Caratterizzazione della colonna

Al fine di determinare il volume di esclusione della colonna, una serie di misure di cromatografia di esclusione (ISEC) sono state effettuate, utilizzando un detector a serie di diodi (il segnale UV è stato registrato a 254nm). Diversi standard di polistireni di diverso peso molecolare sono stati disciolti in tetraidrofurano (THF) e successivamente iniettati nella colonna in condizioni analitiche (5µL loop), vedi Figura3.20.

Il modello lineare $V_R - V_{exCol} = a * PM^{1/3} + b$ con coefficiente (nell'intervallo di confidenza del 95%) fornisce i seguenti risultati: $a = -2.656e-005$ (-4.825e-005, -4.861e-006) e $b = 0.04296$ (0.04046, 0.04546), dove b, l'intercetta, fornisce il valore del volume di esclusione V_e . Con questo dato è possibile calcolare anche il valore della porosità esterna (ε_e) ed interna (ε_i) della colonna [86]:

$$\begin{aligned} \varepsilon_e &= V_e/V_{Col} \\ \varepsilon_i &= \varepsilon_T - \varepsilon_e \end{aligned} \quad (3.20)$$

dove V_e è il volume di ritenzione delle molecole escluse, che si può determinare dal

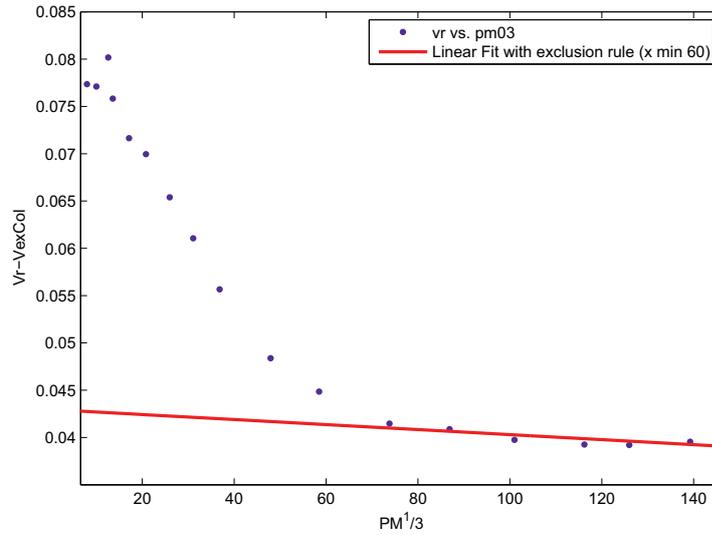


Figura 3.20: ISEC con fitting lineare per la determinazione del volume di esclusione, Colonna: C8 RP300, 300Å, 150x1mm, 5μm, MP:100% THF, Flusso: 5μL/min, Loop: 5μL

grafico in Figura 3.20 e V_{Col} è il volume della colonna, che si può calcolare semplicemente con l'espressione $V_{Col} = \pi r^2 l$ utilizzando il raggio e la lunghezza della colonna. Dai dati sperimentali nel nostro caso per la porosità esterna ed interna sono stati determinati i seguenti valori: $\varepsilon_e = 0.356$ e $\varepsilon_i = 0.567$.

3.4.5 Analisi Frontale dell'Insulina

L'analisi frontale (FA) è il metodo più accurato per la misura dell'isoterma di adsorbimento, e presenta il grande vantaggio che la calibrazione del detector non è necessaria [5]. Con l'analisi frontale la fase mobile nella colonna è rimpiazzata con una soluzione di analita a concentrazione nota e una curva di breakthrough viene registrata all'uscita della colonna. Con questo genere di curve si può misurare la concentrazione del soluto in fase stazionaria (q), all'equilibrio con un soluto presente in fase mobile alla concentrazione C , considerando la conservazione di massa del soluto tra il tempo in cui la soluzione entra nella colonna e il tempo finale in cui viene raggiunto il plateau di concentrazione [29].

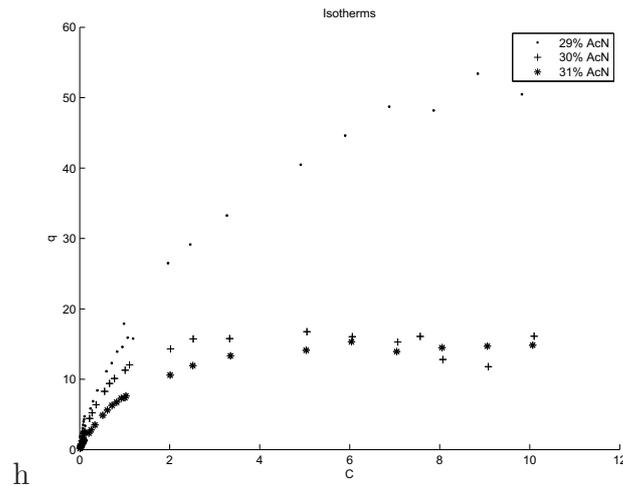


Figura 3.21: Isotherme misurate con FA, Colonna: C8 RP300, 300Å, 150x1mm, 5µm, MP:AcN/mQ/0.1%TFA, Flusso: 5µL/min, Loop: 5µL

Una serie di curve di breakthrough è stata misurata iniettando diverse soluzioni a concentrazione nota di insulina. Per ogni isoterma misurata tramite analisi frontale sono state preparate tre soluzioni di insulina (10g/L, 1g/L e 0.1g/L). Da queste soluzioni "madre" sono state fatte una serie di diluizioni. Tutte le misure sono state fatte ad una lunghezza d'onda di 270nm, con una velocità di flusso di 50µL/min (0.05mL/min) e un loop di 500µL. La isoterme sono state calcolate con la seguente espressione (Eq. 3.21):

$$q = \frac{(V - V_D) \cdot C}{V_{ads}} \quad (3.21)$$

dove q rappresenta la quantità di componente adsorbito in fase stazionaria, V è misurato dal punto di flesso della curva di breakthrough, V_D è il volume vuoto della colonna, C è la concentrazione di analita in soluzione e V_{ads} è il volume di fase adsorbente presente in colonna.

Nella Figura 3.21 sono riportate le tre isoterme dell'insulina misurate con 29%AcN, 71%mq, 0.1%TFA, 30%AcN, 70%mq, 0.1%TFA and 31%AcN, 69%mq, 0.1%TFA. Si può vedere come una minima variazione nella composizione della fase mobile porti ad una grande variazione nel adsorbimento.

I dati acquisiti con l'analisi frontale devono essere fittati in maniera adatta. Nel nostro

caso è stato utilizzato un software di calcolo, MATLAB (MATLAB Versione 7.4.0.287, R2007a, The MathWorks, Inc.). Tutte le misure di isoterme sono state effettuate utilizzando un HPLC Agilent 1100, un rivelatore di tipo Diode Array e la colonna, Alltech Macrosphere, aveva le seguenti caratteristiche: impaccamento tipo C8 RP300, 300Å, 150x1mm, dp=5µm. Il flusso della fase mobile era di 5µL/min e sulla valvola di iniezione (Rheodyne 7725i) era montato un loop di 500µL.

Nelle Figure 3.22, 3.23 e 3.24 sono riportati i fitting Langmuir, BiLangmuir e Toth, per i dati misurati con il 29%AcN, mentre in Figura 3.25 i diversi fitting sono riportati in un unico grafico. Per i dati misurati con il 30% AcN i fitting sono riportati nello stesso modo nella Figure 3.26 -3.29 e 3.30 -3.33. La Tabella 3.7 riporta i vari dati per i diversi fitting.

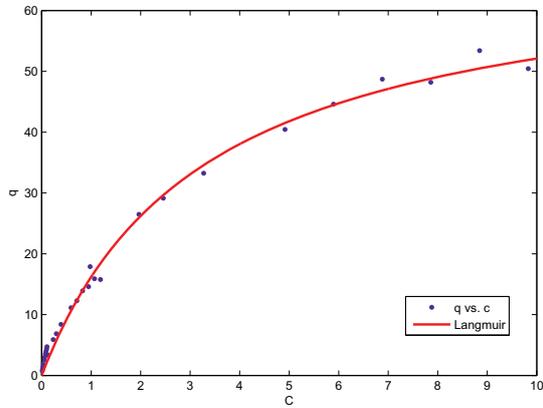


Figura 3.22: Isotherma Langmuir misurata con FA al 29% AcN 71% mQ e 0.1% TFA.

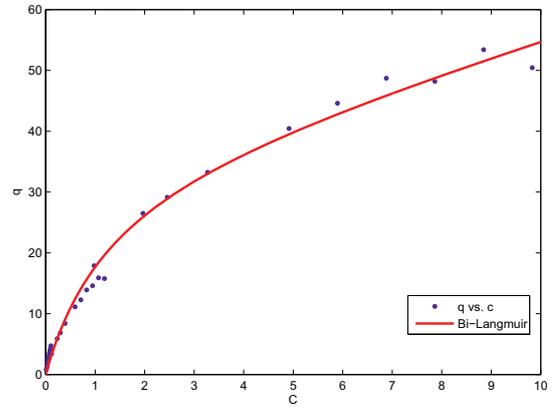


Figura 3.23: Isotherma BiLangmuir misurata con FA al 29% AcN 71% mQ e 0.1% TFA.

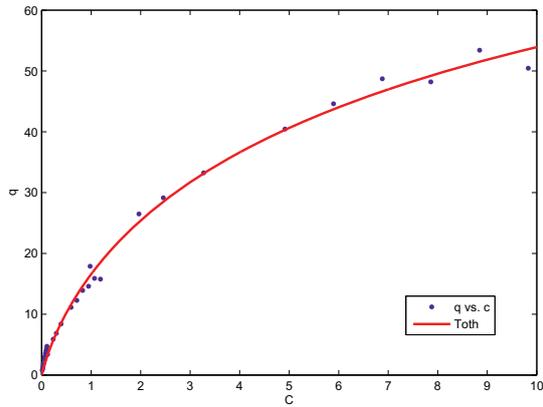


Figura 3.24: Isotherma Toth misurata con FA al 29% AcN 71% mQ e 0.1% TFA.

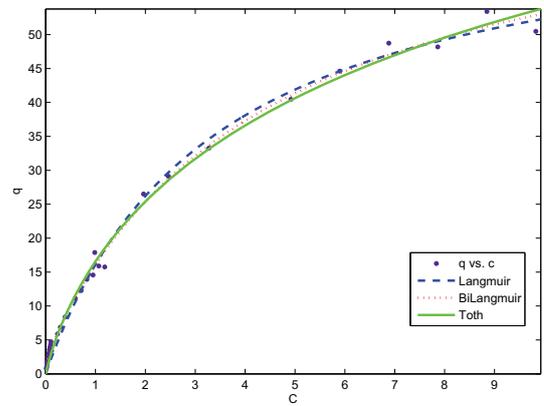


Figura 3.25: Isotherme misurate con FA al 29% AcN 71% mQ e 0.1% TFA.

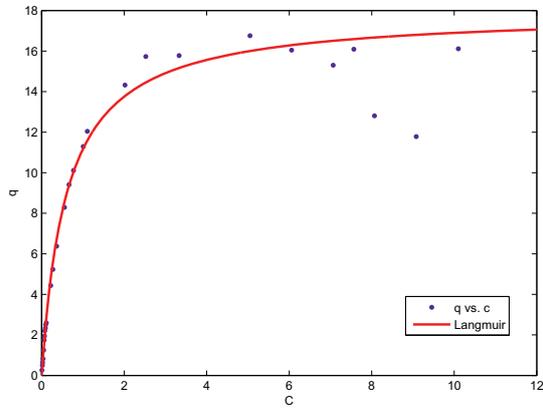


Figura 3.26: Isotherma Langmuir misurata con FA al 30% AcN 70% mQ e 0.1% TFA.

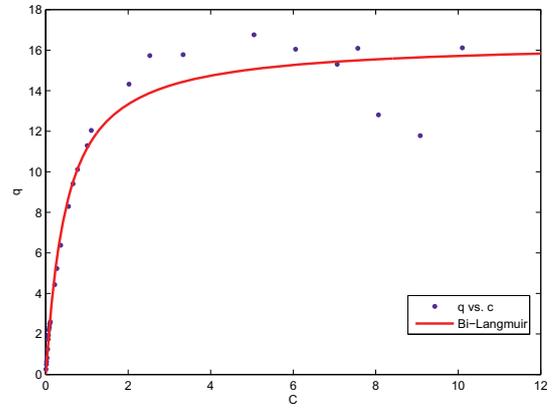


Figura 3.27: Isotherma BiLangmuir misurata con FA al 30% AcN 70% mQ e 0.1% TFA.

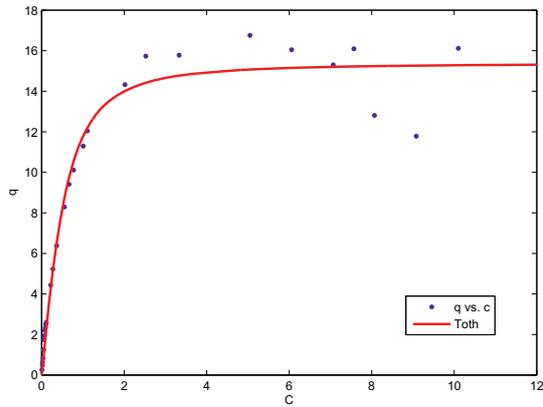


Figura 3.28: Isotherma Toth misurata con FA al 30% AcN 70% mQ e 0.1% TFA.

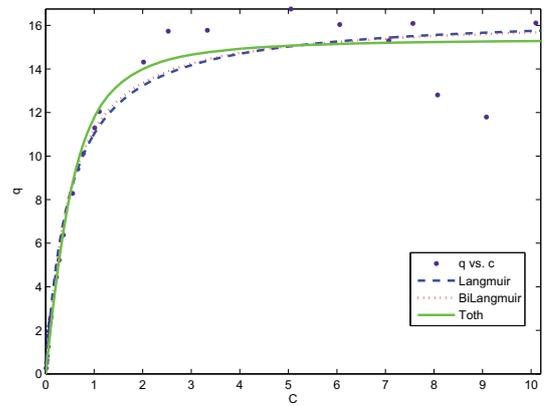


Figura 3.29: Isotherme misurate con FA al 30% AcN 70% mQ e 0.1% TFA.

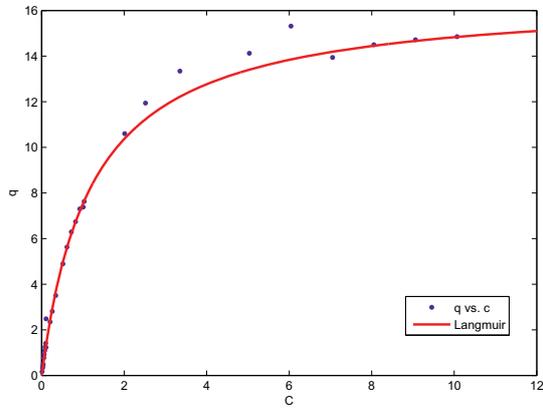


Figura 3.30: Isotherma Langmuir misurata con FA al 31% AcN 69% mQ e 0.1% TFA.

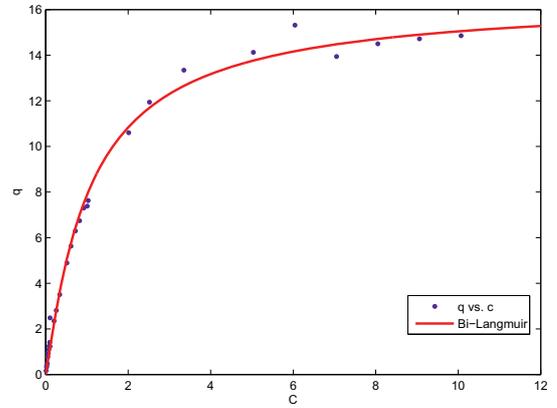


Figura 3.31: Isotherma BiLangmuir misurata con FA al 31% AcN 69% mQ e 0.1% TFA.

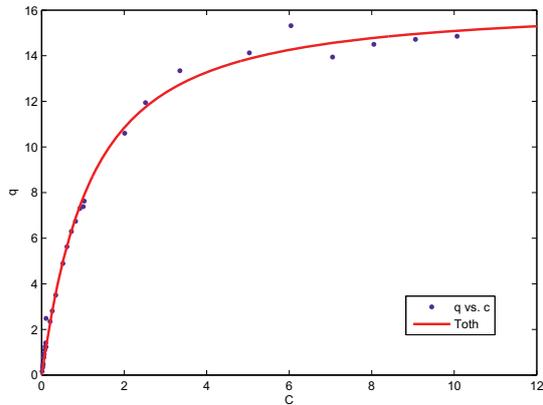


Figura 3.32: Isotherma Toth misurata con FA al 31% AcN 69% mQ e 0.1% TFA.

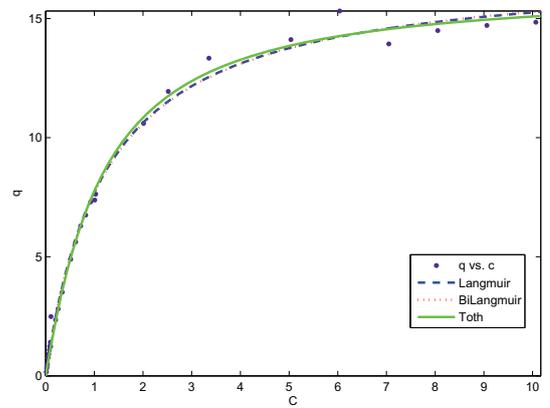


Figura 3.33: Isotherme misurate con FA al 31% AcN 69% mQ e 0.1% TFA.

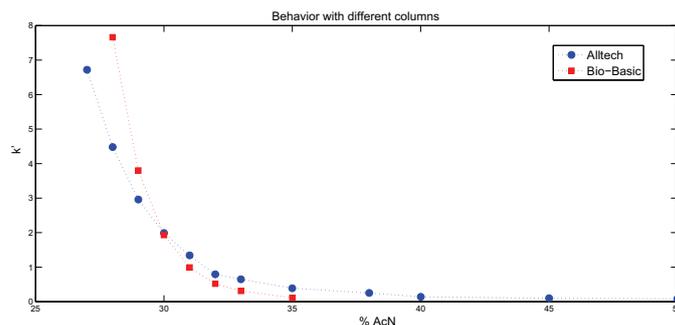


Figura 3.34: Comportamento dell'insulina con colonne diverse ma dalle stesse caratteristiche tecniche

3.4.6 Paragone tra differenti colonne

Il comportamento dell'insulina è stato studiato con due colonne di caratteristiche molto simili. Infatti, oltre alla colonna Alltech anche una colonna Bio-Basic (Thermo Scientific) è stata utilizzata per le medesime misure. Anche per questa seconda colonna l'impaccamento consisteva in silice derivatizzata con colonne C8, 300\AA , $150 \times 1\text{mm}$, $5\mu\text{m}$. In questa seconda parte del lavoro è stato studiato il diverso comportamento di ritenzione tra le due colonne alle stesse condizioni di fase mobile. Nella tabella 3.8 sono riportati i valori del fattore di ritenzione k' , dati dal seguente rapporto: $(T_R - T_0)/(T_0 - T_{ex})$, dell'insulina misurati in diverse composizioni di fase mobile su entrambe le colonne, iniettata in condizioni lineari con un loop di $5\mu\text{L}$, e un flusso di $50\mu\text{L}/\text{min}$. T_R rappresenta il tempo di ritenzione, T_0 l'hold up time, o tempo morto della colonna, e T_{ex} il tempo necessario all'analita per percorrere il volume extra colonna. Per la colonna Alltech il T_{ex} era di 0.28min , e per la colonna Bio-Basic era di 0.226min . Nella Figura 3.34 i valori di k' sono riportati in grafico contro le percentuali di Acetonitrile presente nella fase mobile. Le colonne presentano un comportamento molto simile con un'inversione nella zona del 30% di AcN. Infatti, a valori minori la colonna Alltech presenta una ritenzione minore, mentre a valori di fase mobile con percentuale di acetonitrile maggiore del 30% l'insulina sulla colonna Alltec ha una ritenzione maggiore rispetto alla colonna Bio-Basic.

Langmuir					
$q = (q_s * b * c)/(1 + b * c)$					
%AcN	b	q_s	R^2		
29	0.3056	69.15	0.9915		
30	1.65	17.92	0.9912		
31	0.8284	16.62	0.9990		
Bi-Langmuir					
$q = (q_{s1} * b_1 * c)/(1 + b_1 * c) + (q_{s2} * b_2 * c)/(1 + b_2 * c)$					
%AcN	b_1	b_2	q_{s1}	q_{s2}	R^2
29	0.7418	-0.002165	36.26	-1026	0.9908
30	3.406	3.374	-920.4	936.9	0.9824
31	1.59	1.571	-787.5	804	0.9943
Toth					
$q = (q_s * b * c)/(1 + (b * c)^n)^{1/n}$					
%AcN	b	n	q_s	R^2	
29	0.1974	0.3214	354.4	0.9954	
30	1.397	1.305	16.87	0.9905	
31	0.82	1.019	16.52	0.9985	

Tabella 3.7: Dati dai fitting delle Isoterme, Colonna: C8 RP300, 300Å, 150x1mm, 5µm, Flusso: 5µL/min, Loop: 500µL

%mQ	% AcN	k' Alltech	k' Bio-Basic
72	28	4.48	7.66
71	29	2.96	3.80
70	30	1.99	1.93
69	31	1.34	0.99
68	32	0.79	0.52
67	33	0.65	0.31
65	35	0.39	0.11

Tabella 3.8: Comportamento dell'insulina a diverse composizioni di fase mobile, Colonna Alltech e Bio-Basic.

3.4.7 Risultati ottenuti

Lavorando in fase inversa, con una fase stazionaria di tipo C8, sono stati studiati gli equilibri di adsorbimento dell'insulina variando la composizione della fase mobile, notando come piccoli cambiamenti percentuali di modificatore organico portino ad avere fenomeni di adsorbimento molto differenti. Si è notato come utilizzando due colonne con caratteristiche identiche di dimensioni e tipo di impaccamento si possano ottenere comportamenti di ritenzione differenti. In tutti i casi studiati il miglior fitting è stato ottenuto con il modello di isoterma di Toth, che prende in considerazione la presenza di siti a diversa energia. Il fitting peggiore è risultato quello con il modello Bi-Langmuir. Nella Figura 3.35 sono riportati per i casi al 29, 30 e 31% di acetonitrile i fitting con il modello di Toth.

Si è potuto inoltre studiare il comportamento della proteina ad elevate concentrazioni, osservando anche la sua tendenza a formare dimeri. Dalle misure si è potuto notare che i valori misurati ad elevate concentrazioni presentavano un andamento irregolare, con un'elevata dispersione, cosa che si può notare soprattutto nei dati misurati con il 30% AcN, 70% mQ e 0.1% TFA. La possibile spiegazione di questo fatto è la formazione del dimero dell'insulina, che avviene tramite un'autoaggregazione in particolari condizioni di pH e forza ionica [79]. Per giustificare questa formazione sono state eseguite delle misure di dicroismo circolare e di spettrometria di massa. Le spettroscopia di dicroismo circolare

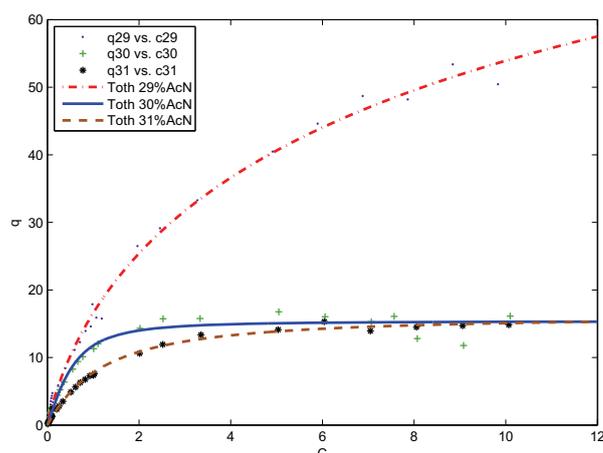


Figura 3.35: Toth fit for isotherms measured by FA, Column: C8 RP300, 300Å, 150x1mm, 5µm, MP:AcN/mQ/0.1%TFA, Flow: 5µL/min, Loop: 5µL

è usata per ottenere informazioni sulla struttura secondaria di proteine o polipeptidi in soluzione [87]. Tre soluzioni di insulina sono state preparate in acetonitrile al 29, 30 e 31%. Le soluzioni sono state iniettate nella colonna in condizioni lineari, e all'uscita del detector è stato detectato un solo picco. Le stesse soluzioni studiate con il dicroismo circolare non hanno mostrato presenza di agglomerati su tutto considerando una finestra dai 180 ai 310nm. Purtroppo questa tecnica non ha una grande risoluzione, infatti se gli agglomerati fossero presenti in concentrazioni molto basse non si riuscirebbe a risolverli. Si è così pensato di eseguire delle iniezioni con uno spettrometro di massa. Le soluzioni al 29, 30 e 31% sono state iniettate in condizioni di overloading e campionate all'uscita della colonna. Si sono preparate due frazioni, una con la prima parte del picco in overloading e una con la seconda parte. Iniettando queste due frazioni nello spettrometro di massa si è notato, soprattutto nella seconda frazione, quella che rappresentava la seconda parte del picco in overloading, la presenza del dimero dell'insulina in tutte e tre le diverse composizioni di fase mobile. In questo spettri si sono infatti notati diversi picchi, come riportato in tabella 3.36. Nella colonna *Identificazione picco* M rappresenta la massa del monomero (5808 Da) mentre 2M la massa del rispettivo dimero dell'insulina. La Figura 3.37 riporta lo spettro di massa misurato per la soluzione preparata nella fase mobile al

Valore di m/z	Identificazione picco
1603.08	$[M + 5H]^{5+}$
1453.33	$[M + 4H]^{4+}$
1937.33	$[M + 3H]^{3+}$
2323.92	$[2M + 5H]^{5+}$
2904.75	$[2M + 4H]^{4+}$

Figura 3.36: Picchi dello spettro di massa per le soluzioni di insulina nelle diverse composizioni di fase mobile

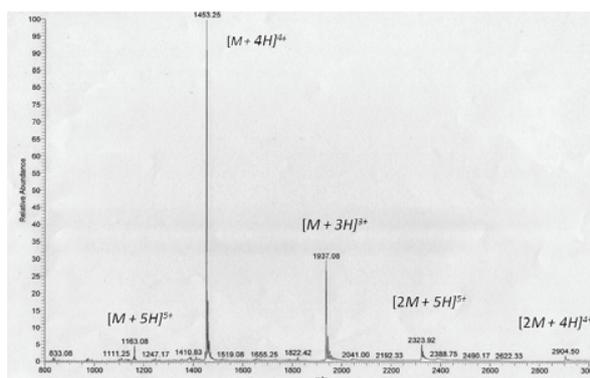


Figura 3.37: Spettro di massa del campione preparato con 29 %AcN

29% di Acetonitrile. Anche le soluzioni preparate al 30 e 31% di acetonitrile presentano gli stessi picchi, confermando la formazione del dimero dell'insulina.

3.5 Cinetica di trasferimento di massa in supporti monolitici

La caratterizzazione di colonne monolitiche viene spesso effettuata paragonando la loro efficienza con quella di colonne impaccate [88–90].

L'efficienza cromatografica di tre colonne di diversa struttura è stata paragonata tramite la studio dei cromatogrammi ottenuti per una separazione di una miscela di cinque componenti: uracile, benzaldeide, nitrobenzene, etilbenzene, butilbenzene. Le colonne paragonate sono: una colonna impaccata (Symmetry) C18 (150 x 0.32 mm) con particelle di diametro di $5\mu\text{m}$ e due colonne monolitiche di nuova generazione. Queste ultime sono state ottenute tramite polimerizzazione di una miscela di un monomero e un cross-linker tramite irradiazione da raggi gamma. Per la preparazione di entrambe le colonne è stato utilizzato lo stesso monomero (Hexyl(Meth)Acrylate), mentre come cross-linker si sono utilizzati due polimeri simili ma di diversa lunghezza: il Tri(ethylene glycol) methyl ether methacrylate per la colonna denominata ACR (275 x 0.25 mm) e (Ethylene glycol) methyl ether methacrylate per la colonna KGy (250 x 0.25 mm). Il sistema utilizzato era composto da pompe CapLC Waters 2996, un detector tipo micro UVis Carlo Erba. I cromatogrammi studiati sono stati registrati lavorando a 22°C con una lunghezza d'onda di 214nm .

Per i vari picchi sperimentali studiati sono stati eseguiti i fitting utilizzando in alcuni casi come modello una gaussiana, e per altri una gaussiana modificata esponenzialmente. Dai dati dei fitting sono stati successivamente calcolati i momenti dei picchi, da cui si è potuto ricavare il valore dell'efficienza cromatografica H , altezza relativa ad un piatto teorico, rifacendosi al concetto delle colonne di distillazione. I valori così ottenuti sono stati studiati con diverse metodologie, come ad esempio avvalendosi di equazioni di tipo semi empirico come le equazioni di Van Deemter, Knox e Giddings. Lo studio degli effetti di tipo cinetico è stato perseguito anche valutando i diversi contributi al valore dell'efficienza cromatografica, considerando il General Rate Model. Ulteriori studi sono stati effettuati riguardanti diversi plot di tipo cinetico, per ricavare ulteriori informazioni

riguardanti la cinetica di trasferimenti di massa delle varie colonne.

3.5.1 Determinazione dell'efficienza cromatografica

La determinazione dell'efficienza cromatografica è stata effettuata studiando la forma dei picchi in uscita dalle colonne. I cinque composti (uracile, benzaldeide, nitrobenzene, etilbenzene, butilbenzene) sono stati iniettati utilizzando una fase mobile composta al 60% di Acetonitrile e 40% di Acqua e diverse velocità di flusso. I picchi sono stati fittati con un opportuno modello al fine di determinarne il tempo di ritenzione e la varianza. Questi parametri sono di facile determinazione con l'utilizzo dell'analisi dei momenti (Eqs. 2.12 - 2.14), e sono necessari per correlare la forma del picco all'efficienza della colonna H (Eq. 2.15).

Lavorando in condizioni analitiche in genere viene fatta l'assunzione che la forma dei picchi in uscita dalla colonna sia simmetrica, con un profilo rappresentabile con una funzione Gaussiana (Eq. 3.22), da cui è facile determinare il tempo di ritenzione (t_R), come il punto centrale della curva, determinabile tramite il momento primo (μ_1), e la varianza (σ), come l'ampiezza del picco a metà altezza, equivalente al momento secondo centrale (μ_2'). Sfortunatamente, diversi effetti di disturbo intervengono nella separazione cromatografica, portando ad avere un picco distorto [91]. L'espressione classica di una Gaussiana viene scritta con la seguente equazione:

$$f(t) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} \exp\left(-\frac{(t-m)^2}{2\sigma^2}\right) \quad (3.22)$$

dove t è il tempo e m è il massimo del picco.

Per descrivere i picchi cromatografici asimmetrici si utilizza un modello di una Gaussiana distorta da un decadimento del primo ordine, causato per esempio dal volume morto dell'iniettore o dal volume della cella del detector, etc. Il modello di una Gaussiana modificata esponenzialmente (EMG model) [92] (Eq. 3.23) fornisce un grande aiuto per determinare il miglior fitting per il picco che presenta un andamento asimmetrico:

$$f(t) = \exp\left(\frac{\sigma^2}{2\tau^2} - \frac{t-m}{\tau}\right) \left(1 - \operatorname{erf}\left(\frac{\sigma}{\sqrt{2}\tau} - \frac{t-m}{\sqrt{2}\sigma}\right)\right) \quad (3.23)$$

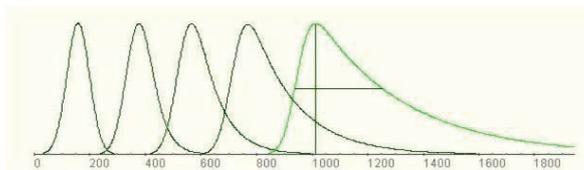


Figura 3.38: Dal modello Gaussiano al modello Esponenziale Modificato

dove τ è la costante di tempo relativa al decadimento esponenziale. Tramite questo secondo modello è stato possibile determinare correttamente il tempo di ritenzione e la varianza direttamente dal fitting dei picchi, infatti il momento primo si può calcolare dalla seguente espressione:

$$\mu_1 = m + \tau \quad (3.24)$$

mentre il momento secondo centrale diventa:

$$\mu'_2 = \sigma^2 + \tau^2 \quad (3.25)$$

3.5.2 Paragone tra le colonne monolitiche e impaccate tramite efficienza cromatografica

Un metodo classico per paragonare colonne di differente impaccamento è tramite lo studio della diversa efficienza cromatografica. Nel lavoro svolto, per la colonna Symmetry gli analiti sono stati iniettati a diverse velocità di flusso, da $0.25\mu L/min$ a $6\mu L/min$. Per le due colonne monolitiche invece si è arrivati fino a $10\mu L/min$, e questo è stato possibile perché grazie alla loro struttura presentano una minor resistenza al flusso e anche ad elevate velocità non si hanno pressioni eccessive, cosa che con la colonna impaccata invece avviene. Tutti i picchi iniettati sono stati singolarmente fittati con i diversi modelli e per ciascuno si è scelto il fitting migliore. Dai valori ricavati per il momento primo e il momento secondo centrale sono stati calcolati i valori dell'efficienza cromatografica, H , attraverso l'equazione 2.15. Nella Figura 3.39 sono riportati i valori di H (m) contro i valori della velocità lineare u (m/s) per le tre colonne nel caso del composto più ritenuto, il Butilbenzene. Per la colonna Symmetry i dati riportati sono di numero inferiore dato che le alte velocità di flusso non sono raggiungibili. Si può vedere dalla figura come le

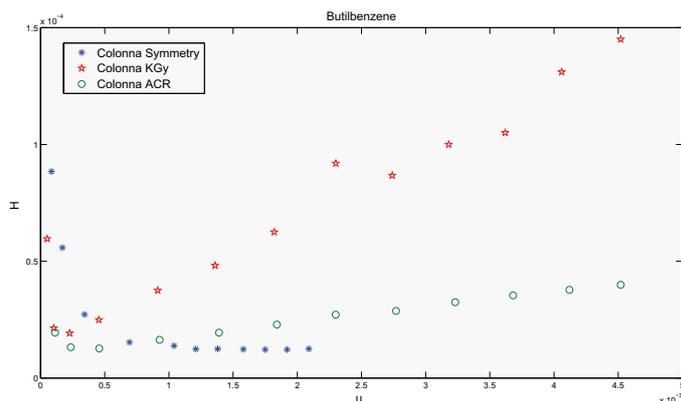


Figura 3.39: Grafico H vs. u per l'Etilbenzene

colonne monolitiche, che presentano una minor resistenza di flusso, abbiano un valore di H maggiore rispetto alla colonna impaccata, che invece ha una maggiore resistenza al flusso [93].

I valori di H , posti in grafico contro i corrispettivi valori di velocità lineare (u_0), sono stati fittati con il modello di Van Deemter (Equazione 2.3). I valori ricavati per i tre parametri A , B e C sono riportati nella tabella 3.9.

Per quanto riguarda il termine della dispersione Eddy (A), la colonna KGy, quella con il linker di lunghezza minore, presenta il valore più basso in tutti i casi studiati. Il termine di diffusione assiale, B , presenta valori di circa lo stesso ordine di grandezza in ogni caso, e non porta ad una discriminazione sull'efficienza totale delle colonne. Il termine riguardante gli effetti di trasferimento di massa (C) presenta i valori minori nel caso della colonna impaccata, ad eccezione del caso della Benzaldeide, il composto meno ritenuto. Le colonne monolitiche presentano una bassa resistenza e permettono così di lavorare con velocità di flusso maggiori, il che porta a tempi più brevi, però presentano il termine riguardante i trasferimenti di massa con un valore maggiore rispetto alla colonna classica impaccata.

		Symmetry	ACR	KGy
Benzaldeide	A (<i>cm</i>)	4.30E-04	3.88E-04	5.89E-06
	B (cm^2s^{-1})	2.66E-05	2.93E-06	1.59E-05
	C (s^{-1})	4.50E-03	2.89E-03	5.58E-03
Nitrobenzene	A (<i>cm</i>)	3.07E-04	8.34E-04	4.28E-06
	B (cm^2s^{-1})	3.27E-05	1.09E-05	2.65E-05
	C (s^{-1})	4.30E-03	5.11E-03	1.78E-02
Etilbenzene	A (<i>cm</i>)	3.42E-05	1.30E-04	6.53E-06
	B (cm^2s^{-1})	5.92E-05	2.19E-05	2.66E-05
	C (s^{-1})	4.15E-03	7.31E-03	1.94E-02
Butilbenzene	A (<i>cm</i>)	5.27E-04	7.63E-04	1.24E-05
	B (cm^2s^{-1})	6.62E-05	1.09E-05	2.21E-05
	C (s^{-1})	1.25E-03	5.68E-03	2.65E-02

Tabella 3.9: Dati fitting Van Deemter colonne Symmetry, ACR e KGy

3.5.3 Paragone colonne monolitiche e impaccate tramite metodi cinetici

I plot di tipo cinetico permettono di paragonare colonne con diverso tipo di impaccamento, valutando variabili diverse rispetto al classico grafico di Van Deemter, che considera esclusivamente l'efficienza e la velocità lineare [94].

Per permettere una percolazione costante di fase mobile attraverso una colonna cromatografica si deve mantenere una data pressione, ΔP , legata alle caratteristiche della colonna, della fase mobile e della velocità del flusso:

$$\Delta P = \frac{\mu u_F L}{k_{p,F}} \quad (3.26)$$

dove μ è la viscosità della fase mobile, u_F è la velocità superficiale, ottenuta dal prodotto della velocità lineare u_0 per la porosità totale della colonna, L è la lunghezza della colonna e $k_{p,F}$ è la permeabilità della colonna, che nel caso di una colonna impaccata può essere ottenuta dal prodotto tra la porosità specifica della colonna k_F per il diametro delle

particelle impaccanti elevato al quadrato. Nel caso di una colonna impaccata la porosità specifica della colonna è legata alla porosità esterna dalla seguente equazione:

$$k_F = \frac{\varepsilon_e^3}{180(1 - \varepsilon_e)^2} \quad (3.27)$$

la determinazione della porosità nelle colonne monolitiche può essere effettuata come nelle colonne impaccate tramite cromatografia "ISEC", con l'iniezione di standard di polistirene [86]. Nel caso di colonne monolitiche la permeabilità della colonna viene determinata da:

$$k_{p,F} = l^2 \frac{\varepsilon_e^3}{(1 - \varepsilon_e)^2} \quad (3.28)$$

Le colonne monolitiche presentano in genere una porosità esterna maggiore delle colonne impaccate, che comporta anche un valore di permeabilità maggiore. Nella teoria dei plot di tipo cinetico vengono considerate due equazioni principali:

$$t_0 = \left(\frac{\Delta P}{\mu} \right) \left[\frac{k_{p,F} \varepsilon_T}{u_F^2} \right] \quad (3.29)$$

$$N = \left(\frac{\Delta P}{\mu} \right) \left[\frac{k_{p,F}}{u_F H} \right] \quad (3.30)$$

Un metodo utile per confrontare colonne con differente impaccamento si può ottenere tramite dei grafici (chiamati plot tipo Poppe) che pongono in ordinata il $\log(t_0/N)$ e in ascissa il valore $\log N$ [4]. Considerando che la lunghezza della colonna è equivalente a $L = HN = t_0 u_0$ è facile capire che questi grafici siano molto simili al plot di H contro u_0 , dato che il $\log(H/u_0)$ è uguale a $\log(t_0/N)$ [93]. La figura 3.40 riporta i valori per questo tipo di grafico per le tre colonne studiate nel caso del Butilbenzene. Da questo tipo di grafico si possono vedere gli effetti del diametro delle particelle. Colonne impaccate con particelle più piccole danno separazioni più veloci, ma per un numero maggiore di piatti servono colonne con particelle più grandi [95].

Dalla figura sembrerebbe che la colonna di tipo impaccato abbia il diametro delle particella di dimensione minore, mentre le due colonne monolitiche presentino un diametro delle particelle molto simile. Per quest'ultimo tipo di colonne la determinazione del d_p è un punto critico in quanto, avendo un corpo unico all'interno della colonna, non presentano

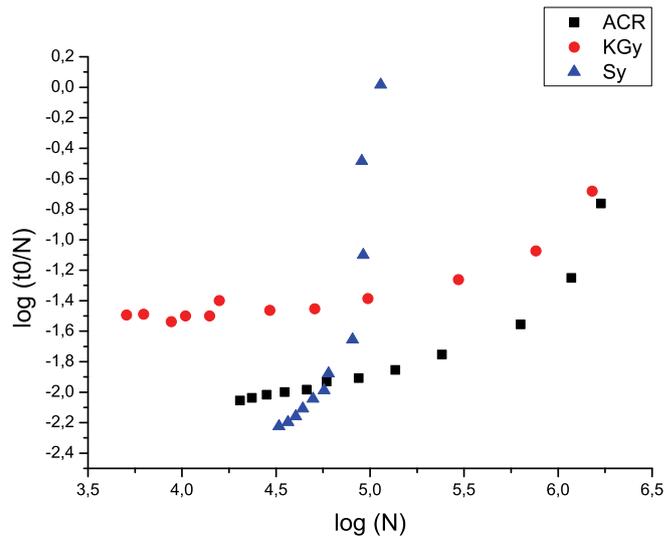


Figura 3.40: Plot tipo Poppe per Butilbenzene

delle particelle porose classiche, e il valore del diametro deve essere ricavato tramite misure indirette o approssimazioni [96–99].

Lo studio di altri plot di tipo cinetico può essere affrontato considerando altre variabili ricavate dalle due equazioni fondamentali della teoria cinetica [95, 100, 101], ma nel nostro caso non sono risultate utilizzabili per discriminare le caratteristiche del diverso impaccamento delle colonne studiate.

3.6 Sviluppo di un metodo analitico per la determinazione quantitativa dello Iomeprolo nel plasma umano.

Lo studio di un farmaco utilizzato come mezzo di contrasto per l'analisi delle malattie renali, lo Iomeprolo [102], è stato effettuato su una colonna fenilica, al fine di sviluppare un metodo analitico per la sua determinazione quantitativa nel plasma umano. Per la corretta determinazione e quantificazione si è fatto uso di uno standard interno (Iopromide). È stato utilizzato un sistema bidimensionale al fine di purificare il campione da tutte le proteine contenute nel plasma, si è utilizzata una colonna SPE (solid phase extraction), che riteneva solo le molecole di piccole dimensioni, come l'analita di interesse, mentre non tratteneva le molecole più grandi, grazie ad un particolare impaccamento di tipo RAM (restricted access material) in serie con una colonna analitica [103, 104]. Per la scelta della colonna analitica da utilizzare è stato effettuato uno studio con un kit di colonne con diverso impaccamento e diversa lunghezza (POPLC- Phase OPTimised Liquid Chromatography). Definendo una fase mobile iniziale con le caratteristiche volute (pH, composizione, forza ionica) si inietta una miscela dei componenti da separare in colonnine impaccate con diversi tipi di particelle (colonna C18 classica, colonna C18 con gruppi amidici, colonna fenilica, colonna con gruppi CN, colonna C30). I dati di ritenzione e selettività ottenuti dalle varie separazioni vengono introdotti in un software che calcola la composizione dell'impaccamento e la lunghezza ottimale della colonna da utilizzare. Nel nostro caso, studiando la separazione dello Iomeprolo e Iopromide, la scelta della fase mobile è stata una miscela Metanolo (35%) e Acqua di MilliQ (65%) e la colonna indicata dal software per la miglior separazione in questo caso è una colonna fenilica di lunghezza 250 mm. L'analisi dei componenti è stata divisa in alcuni step: il frazionamento, che avveniva nella colonna SPE, durante il quale le proteine del plasma venivano eliminate, la fase di trasferimento degli analiti dalla colonna SPE a quella analitica e la fase di separazione. Durante quest'ultima fase la colonna SPE veniva lavata con Metanolo puro e ricondizionata con la fase mobile. Paragonando l'efficienza della colonna POPLC con

una colonna commerciale di simili caratteristiche (impaccamento fenilico ma più corta e con particelle più piccole) si è deciso di utilizzare la seconda colonna, in quanto presentava una migliore efficienza. Le condizioni sperimentali sono state ottimizzate in fatto di composizione di fase mobile e temperatura. Al fine di validare il metodo sono stati studiati diversi parametri. La selettività è stata testata con il confronto tra un plasma non trattato e uno trattato con l'analita. I limiti di rilevazione e quantificazione sono stati definiti in relazione al rumore della linea di base (moltiplicandolo rispettivamente per 3 e per 10). Il recupero è stato misurato confrontando i valori ottenuti con e senza l'utilizzo della colonna SPE. La linearità del metodo è stata ottenuta da un fitting lineare dei valori di concentrazione calcolati e quelli introdotti. La precisione è ottenuta considerando i valori della deviazione standard di vari campioni preparati. L'accuratezza del metodo è stata stimata dalla differenza percentuale tra il valore calcolato e quello vero della concentrazione dei campioni standard.

3.6.1 Scelta del metodo analitico

Lo Iomeprolo (1-N,3-N-bis(2,3-dihydroxypropyl)-5-[(2-hydroxyacetyl)-methylamino]-2,4,6-triiodobenzene-1,3-dicarboxamide), è utilizzato come mezzo di contrasto per la procedura diagnostica attraverso immagini dalla tecnica dei raggi X. In campo farmaceutico è conosciuto come "Iomeron", ed in genere viene ben tollerato dall'organismo per i trattamenti clinici. I mezzi di contrasto basati sullo Iodio possono essere ionici o non-ionici: lo Iomeprolo (IOM) è una molecola non-ionica e monomeric. In questo studio è stato sviluppato un metodo analitico utilizzando la cromatografia liquida ad elevate prestazioni con il metodo cosiddetto "column switching" [105] al fine di determinare la presenza, la persistenza e la quantità di Iomeprolo presente in campioni di tipo biologico. Per effettuare queste misure infatti sono stati utilizzati campioni di plasma umano. Con la cromatografia liquida si possono separare diversi analiti in un'unica corsa cromatografica e, una volta determinato il loro tempo di ritenzione e una separazione soddisfacente, si può utilizzare una curva di calibrazione per determinare la quantità di analita presente nel campione. A volte, prima dell'iniezione di un campione in colonna, è necessario procedere con uno

step di purificazione, al fine di rimuovere tutti gli effetti matrici che potrebbero interferire con l'analisi. Nel caso di campioni biologici come il plasma umano ad esempio, tutte le proteine plasmatiche, come l'albumina, devono essere rimosse dal campione, dato che non possono essere iniettate in colonna, sia per evitare sovrapposizioni di picchi, che per non accorciare il tempo di vita della colonna. In genere la separazione è uno step del procedimento che avviene in un tempo separato rispetto all'analisi [106–114]. Diversi autori per esempio utilizzano acido perclorico o etanolo per precipitare le proteine del plasma prima di analizzare il plasma, e dopo una centrifugazione procedono con l'analisi del surnatante. Con questo metodo si introducono diversi step minori rispetto al processo analitico vero e proprio che possono introdurre diversi tipi di errori nell'analisi, e in genere portano ad avere un tempo di analisi totale molto lungo.

3.6.2 Column Switching Mode

In questo lavoro è stato adottato un sistema bidimensionale per determinare il comportamento del plasma umano con l'utilizzo di due colonne poste in serie. Per integrare la purificazione del campione con la sua analisi una colonna per estrazione in fase solida (SPE) Oasis HLB (Waters, MA, USA), è stata accoppiata con una colonna analitica (inizialmente tipo POPLC, fenilica, 250x3mm, $dp=5\mu m$ (Bischoff Chromatography, Leonberg, D) e successivamente una colonna fenilica tipo ProntoSil 130-3, 150x4mm, $dp=3\mu m$ (Bischoff Chromatography). Per connettere le due colonne è stata utilizzata una valvola dieci porte. Quando la valvola è nella prima posizione, il campione, plasma con Iomeprolo e Iopromide come standard interno, viene prelevato dall'autocampionatore, in cui è mantenuto ad una temperatura di 4.4°C, e utilizzando una fase mobile composta dal 100% di Acqua e una velocità di flusso di $2.5 mL/min$ viene mandato nella colonna SPE. Questa colonna, di lunghezza 20mm, diametro interno di 2mm e grandezza della particelle di $30\mu m$, è stata impaccata con un copolimero macroporoso composto da due monomeri, uno lipofilo (divinilbenzene) e uno idrofilo (N-vinilpirrolidone), che permette la ritenzione solo di molecole al di sotto di una determinata dimensione (RAM: Restricted-Access Media). Utilizzando questo particolare tipo di materiale impaccante si ottiene una cromatografia

di tipo "size exclusion", infatti l'albumina e tutte le proteine del plasma non vengono ritenute e mandate direttamente nello scarico, ma le molecole con diametro più piccolo sono ritenute dalla fase stazionaria. Questo primo step è stato denominato "frazione". Dopo 3.2min la valvola passa nella seconda posizione (step di trasferimento), la fase mobile utilizzata, 35% Metanolo, 65%Acqua, con un flusso di 0.4mL/min, trasporta le molecole di analita dalla colonna SPE alla colonna analitica, impaccata con gruppi fenilici, fino a 6.7min. In questa seconda colonna la ritenzione è data dall'affinità del campione con la fase stazionaria, questo secondo tipo di separazione risulta ortogonale rispetto al primo, per cui il sistema si può dire bidimensionale. Il terzo step è quello della "separazione" del campione nella colonna analitica, utilizzando la stessa fase mobile del secondo step. Dopo 6.7min la valvola ritorna nella prima posizione, e una delle due pompe dello strumento continua ad erogare la fase mobile per la separazione, mentre l'altra procede al lavaggio con Metanolo per la colonna SPE e successivamente al ricondizionamento. Nella Figura 3.41 è riportato il cromatogramma ottenuto da un campione di plasma preparato con concentrazioni di Iomeprolo e Iopromide pari a 1000µg/mL. Sommando tutti gli step si otteneva una misurazione completa con lavaggio e ricondizionamento della colonna SPE in 15 minuti. Inizialmente come colonna analitica si è utilizzata una colonna POPLC, composta da diversi segmenti impaccati con particelle feniliche, ottenendo una colonna di 30cm con diametro interno di 3mm e grandezza della particelle di 5µm, sostituita successivamente da una colonna 150x4mm, con particelle da 3µm (ProntoSIL), sempre impaccata con particelle feniliche. Il sistema HPLC era di tipo Dionex Ultimate 3000. Il detector utilizzato era un Diode Array detector, con lampade al deuterio e tungsteno per coprire lunghezze d'onda dell'UV e del visibile. Per preparare i vari campioni il plasma veniva conservato a -28°C, poi fatto scongelare. Quando la soluzione presentava forma liquida veniva centrifugata a 1600 giri per 10 minuti. Il surnatante veniva infine prelevato e a questo veniva aggiunta la Iopromide, una molecola molto simile allo Iomeprolo, come standard interno.

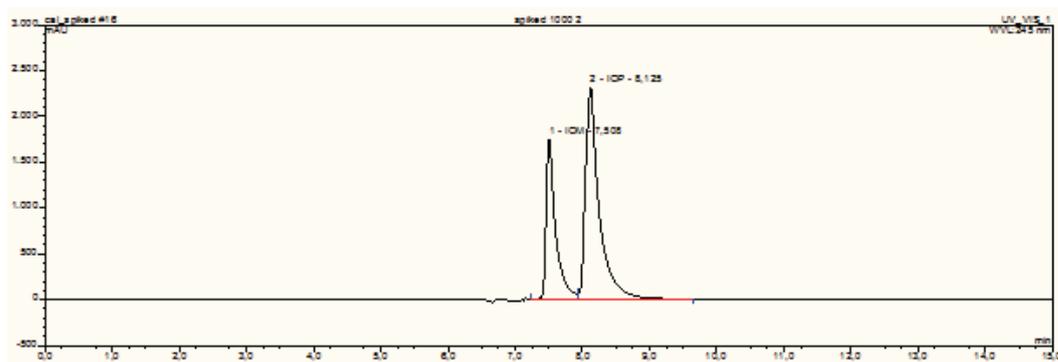


Figura 3.41: Cromatogramma Iomeprolo e Iopromide 1mg/mL

3.6.3 Validazione del metodo

La validazione di un metodo analitico per la determinazione di un farmaco è un processo necessario per garantirne il corretto funzionamento [115]. Al fine di validare il metodo utilizzato sono state eseguite analisi dei campioni in diversi giorni consecutivi, per valutare l'accuratezza e la precisione dei dati ottenuti [116]. Tutti i dati sono stati calcolati con l'utilizzo del software "Chromeleon", paragonando i risultati ottenuti da ogni singola iniezione con una curva di calibrazione. A tutti i campioni sono state aggiunte quantità note di Iopromide (IOP) come standard interno e tutte le iniezioni ripetute almeno due volte. I limiti di linearità misurati dal paragone tra le concentrazioni dei campioni calcolate e quelle iniettate, sono risultati per entrambi gli analiti pari a $2000\mu\text{g}/\text{mL}$, studiando i composti ad una lunghezza d'onda dove presentavano il massimo di assorbanza: 245nm . Per validare il metodo sono stati utilizzati diciotto campioni con sei differenti concentrazioni di Iomeprolo e Iopromide, da $50\mu\text{g}/\text{mL}$ a $1000\mu\text{g}/\text{mL}$. Per la calibrazione in acqua sei campioni sono stati preparati in questo solvente, per la calibrazione nella matrice altri sei campioni sono stati preparati in plasma, e altri sei campioni preparati sempre in plasma sono stati utilizzati come campioni per la validazione. Ogni giorno, prima di ogni serie di iniezioni, entrambe le colonne sono state lavate in controflusso con 30mL di Metanolo, 30mL di Acetonitrile, 30mL di Isopropanolo, 30mL di Diclorometano e 30mL di Tetraidrofurano ($\text{MeOH} - \text{AcN} - \text{IPA} - \text{CH}_2\text{Cl}_2 - \text{THF} - \text{CH}_2\text{Cl}_2 - \text{IPA} - \text{AcN} - \text{MeOH}$). Dopo il lavaggio, tutti i campioni sono stati iniettati ($5\mu\text{L}$) per tre volte. Dato che con

l'utilizzo del metodo "column switching" si eliminano gli effetti matrice, i cromatogrammi ottenuti utilizzando le soluzioni per la calibrazione in acqua e quelli in plasma non mostrano differenze.

Lo scopo di questo lavoro era lo studio della presenza e della persistenza dello Iomeprolo nel plasma umano con l'uso della cromatografia liquida. Per rimuovere le proteine del plasma è stato utilizzato un metodo bidimensionale con una colonna SPE e una colonna analitica poste in serie. All'inizio una colonna formata da diversi segmenti (POPLC) è stata utilizzata, impaccata con gruppi fenilici. Questo tipo di assemblaggio è stato utilizzato dopo una serie di studi di ritenzione dello Iomeprolo e della Iopromide con diversi segmenti POPLC. I segmenti fenilici forniscono la miglior risoluzione tra IOM e IOP, senza la separazione tra i rispettivi diastereoisomeri *eso* e *endo*. L'efficienza della colonna POPLC è stata comparata con un'altra colonna impaccata sempre con gruppi fenilici, ma con diametro delle particelle più piccole. Con questa seconda colonna (ProntoSil) si è ottenuta una miglior efficienza e i picchi presentavano minor dispersione. Per lo step di separazione la fase mobile utilizzata era composta da Metanolo ed Acqua. Le migliori condizioni per la separazione si sono ottenute utilizzando 35% di Metanolo e 65% di Acqua. Utilizzando una minor percentuale di Metanolo il tempo di ritenzione era molto maggiore e il picco dello Iomeprolo presentava una spallatura, mentre con percentuali più alte si perdeva risoluzione. Anche l'influenza della temperatura è stata studiata, ed è stato trovato le migliori condizioni per la separazione di ottenevano settando la temperatura del forno della colonna a 60°C.

I dati per la validazione sono stati studiati in due diversi modi. Il primo secondo la validazione "ICH", utilizzando direttamente il software "Chromeleon" del cromatografo, iniettando una serie di composti per la validazione. Il secondo metodo è stato effettuato con la compagnia "Arlenda" che, inserendo i dati della validazione in un database on-line, fornisce i risultati dei vari processi. Diversi sono i parametri che sono stati studiati: limiti di rilevazione, limiti di quantificazione, linearità, accuratezza, precisione e riproducibilità. Utilizzando entrambi i metodi si è potuto comparare i risultati ed avere un quadro più completo. Con il software "Arlenda" si sono potuti comparare i differenti indici di ac-

curatezza per diversi tipi di modelli di regressione e determinare quale fosse il modello migliore. Nel nostro caso l'indice di accuratezza più elevato è stato di 0.9404, corrispondente al modello di una regressione lineare dopo trasformazione dei minimi quadrati, e in questo caso il valore medio per il coefficiente di determinazione (R^2) ha assunto un valore di 0.9997. Scegliendo questo tipo di report si sono ottenute una serie di informazioni. Comparando la concentrazione calcolata con quella introdotta con una regressione lineare è stato determinato un coefficiente di determinazione pari a 0.997. Il limite di detezione (LOD) è stato valutato essere di $0.2728\mu g/mL$, mentre per il limite di quantificazione questo tipo di report forniva il valore della concentrazione più elevata che era stata misurata durante gli esperimenti. Il livello maggiore e minore dell'errore relativo percentuale per quanto riguarda accuratezza sono risultati rispettivamente di 1.330 e -2.042. La media percentuale del recupero è risultata pari al 99.69%. La precisione intermedia, espressa in termini di percentuale della deviazione standard relativa, è stata determinata con un valore di 0.6678, considerando una media di sei differenti livelli di concentrazione misurati.

Utilizzando la regressione lineare, sempre con il software "Arlenda", è stata determinata un'accuratezza di 0.9292, e un valore medio per il coefficiente di determinazione di 0.9996. Paragonando le concentrazioni calcolate con quelle iniettate con una regressione di tipo lineare, si è trovato un coefficiente di determinazione pari a 0.9997. Il limite di detezione (LOD) è risultato essere di $15.12\mu g/mL$, più di cinquanta volte rispetto al report della regressione lineare dopo la trasformazione dei minimi quadrati. Per quanto riguarda il più alto e il più basso livello di errore relativo percentuale per l'accuratezza sono stati determinati rispettivamente 0.9806 e -8.848. La media percentuale del recupero è risultata pari al 97.98%. Mentre la precisione intermedia, espressa come percentuale della deviazione standard relativa, di 0.8998.

Utilizzando la validazione "ICH", altri dettagli sono stati trovati. In questo caso i dati sono stati studiati con una regressione di tipo lineare. Il recupero medio percentuale determinato ha presentato un valore del 97.2878%, il valore medio della deviazione standard relativa riguardo al recupero è risultata essere pari a 0.1715, solo nel caso della concentrazione minore misurata è stato determinato un valore di 2.556. Il più

alto e il più basso livello di errore relativo percentuale per l'accuratezza sono risultati 0.0678 e -6.92879 rispettivamente, e questo valore più alto è stato trovato solo per il caso della concentrazione minore misurata. La precisione intermedia, espressa in termini di deviazione standard relativa percentuale, è stata determinata pari a 1.0269. In questo report si sono potuti determinare tre tipi di LOD e LOQ: basati sulla deviazione standard del bianco (rispettivamente di $27.43\mu\text{g}/\text{mL}$ e $83.13\mu\text{g}/\text{mL}$), basate sul rapporto segnale-rumore ($14.35\mu\text{g}/\text{mL}$ e $47.82\mu\text{g}/\text{mL}$) e dalla curva di calibrazione ($21.87\mu\text{g}/\text{mL}$ e $66.27\mu\text{g}/\text{mL}$). Per due di questi valori di LOQ la concentrazione da noi misurata per la curva di calibrazione e per i campioni di validazione era troppo bassa.

3.6.4 Campioni studiati

Sono stati testati 84 campioni di plasma provenienti da 30 pazienti. In nessun caso sono state trovate sostanze che hanno interferito con gli analiti di interesse. I campioni sono stati prelevati dai pazienti immediatamente prima della somministrazione dello Iomeprolo (0h), dopo due ore (2h) e dopo quattro ore (4h). Le concentrazioni di Iomeprolo per ogni campione sono riportate nella Figura 3.42. Per ridurre la possibilità di errori una quantità

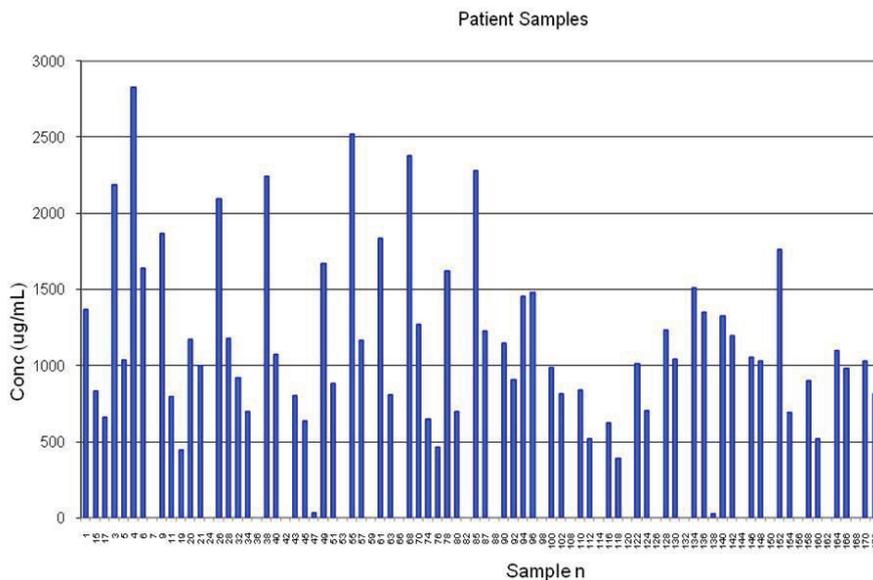


Figura 3.42: Campioni da pazienti

minore di campione ($5\mu L$) è stata iniettata senza essere sottoposta ad alcuna diluizione. Ogni campione è stato preparato aggiungendo $70\mu L$ di Iopromide, come standard interno, a $630\mu L$ di plasma. Per controllare che non ci siano effetti di rimanenza in colonna rispetto alle iniezioni precedenti, un campione di plasma senza Iomeprolo e Iopromide è stato iniettato ogni giorno e anche un campione per il controllo della riproducibilità del sistema. Per alcuni campioni marcati "0h" è stato trovato dello Iomeprolo, probabilmente perché erano stati prelevati dopo la somministrazione dello Iomeprolo e non prima. Non è stato possibile trovare una correlazione tra i campioni prelevati da ogni singolo soggetto (0h-2h-4h) in quanto i pazienti da cui erano stati prelevati erano casi molto diversificati, per peso, età, dieta, disfunzioni renali, etc.

Bibliografia

- [1] T. Fornstedt. Characterization of adsorption processes in analytical liquid-solid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1217(6):792–812, 2010.
- [2] J.C. Giddings. *Dynamics of Chromatography - Part I: Principles and Theory*. Marcel Dekker, New York, 1965.
- [3] U.D. Neue and M.Z. El Fallah. *HPLC columns: theory, technology, and practice*. Wiley-VCH New York, 1997.
- [4] G. Guiochon. Monolithic columns in high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1168(1-2):101–168, 2007.
- [5] G. Guiochon, D.G. Shirazi, A. Felinger, and A.M. Katti. *Fundamentals of preparative and nonlinear chromatography*. Academic Pr, 2006.
- [6] H. Schmidt-Traub. *Preparative chromatography of fine chemicals and pharmaceutical agents*. Vch Verlagsgesellschaft Mbh, 2005.
- [7] M. Martin, C. Eon, and G. Guiochon. Study of the pertinency of pressure in liquid chromatography:: II. Problems in equipment design. *Journal of Chromatography A*, 108(2):229–241, 1975.

- [8] K.M. Usher, C.R. Simmons, and J.G. Dorsey. Modeling chromatographic dispersion: A comparison of popular equations. *Journal of Chromatography A*, 1200(2):122–128, 2008.
- [9] J.C. Giddings. *Unified separation science*. Wiley New York etc, 1991.
- [10] J.H. Knox. Band dispersion in chromatography: a universal expression for the contribution from the mobile zone. *Journal of Chromatography A*, 960(1-2):7–18, 2002.
- [11] G. Guiochon. The limits of the separation power of unidimensional column liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1126(1-2):6–49, 2006.
- [12] K. Miyabe and G. Guiochon. Measurement of the parameters of the mass transfer kinetics in high performance liquid chromatography. *Journal of High Resolution Chromatography*, 26(3-4):155–173, 2003.
- [13] K. Miyabe, Y. Matsumoto, and G. Guiochon. Peak Parking- Moment Analysis. A Strategy for the Study of the Mass-Transfer Kinetics in the Stationary Phase. *Anal. Chem*, 79(5):1970–1982, 2007.
- [14] K. Miyabe, M. Ando, N. Ando, and G. Guiochon. External mass transfer in high performance liquid chromatography systems. *Journal of Chromatography A*, 1210(1):60–67, 2008.
- [15] E. Kucera. Contribution to the theory of chromatography: linear non-equilibrium elution chromatography. *Journal of chromatography*, 19(2):237, 1965.
- [16] I. Bacskay and A. Felinger. Macroscopic and microscopic analysis of mass transfer in reversed phase liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1216(8):1253–1262, 2009.
- [17] A. Cavazzini, K. Kaczmarek, P. Szabelski, D. Zhou, X. Liu, and G. Guiochon. Modeling of the separation of the enantiomers of 1-phenyl-1-propanol on cellulose tribenzoate. *Anal. Chem*, 73(23):5704–5715, 2001.

- [18] L. Hong, A. Felinger, K. Kaczmarski, and G. Guiochon. Measurement of intraparticle diffusion in reversed phase liquid chromatography. *Chemical Engineering Science*, 59(16):3399–3412, 2004.
- [19] J.J. Kipling. *Adsorption from Solutions of Non-Electrolytes*. Academic Press, New York, 1965.
- [20] Y.V. Kazakevich and HM McNair. Study of the excess adsorption of the eluent components on different reversed-phase adsorbents. *Journal of chromatographic science*, 33(6):321–327, 1995.
- [21] A. Cavazzini, G. Nadalini, V. Costa, and F. Dondi. Heterogeneity of adsorption mechanisms in chiral normal-phase liquid chromatography 2-Propanol and ethyl acetate adsorption equilibria. *Journal of Chromatography A*, 1143(1-2):134–142, 2007.
- [22] Y.V. Kazakevich. High-performance liquid chromatography retention mechanisms and their mathematical descriptions. *Journal of Chromatography A*, 1126(1-2):232–243, 2006.
- [23] J.J. Kipling. Adsorption of non-electrolytes from solution. *Quarterly Review*, 5:60–74, 1951.
- [24] H. Freundlich. *Colloid and capillary chemistry*. Methuen & co. ltd, 1926.
- [25] Y.V. Kazakevich, R. LoBrutto, F. Chan, and T. Patel. Interpretation of the excess adsorption isotherms of organic eluent components on the surface of reversed-phase adsorbents Effect on the analyte retention. *Journal of Chromatography A*, 913(1-2):75–87, 2001.
- [26] I. Langmuir. The constitution and fundamental properties of solids and liquids. *J. Am. Chem. Soc.*, 38:2221–2295, 1916.

- [27] P. Jandera, D. Komers, L. Anděl, and L. Prokeš. Fitting competitive adsorption isotherms to the distribution data in normal phase systems with binary mobile phases. *Journal of Chromatography A*, 831(2):131–148, 1999.
- [28] G. Guiochon. Preparative liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 965:129–161, 2002.
- [29] F. Gritti, W. Piatkowski, and G. Guiochon. Comparison of the adsorption equilibrium of a few low-molecular mass compounds on a monolithic and a packed column in reversed-phase liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 978(1-2):81–107, 2002.
- [30] A. Felinger, A. Cavazzini, and G. Guiochon. Numerical determination of the competitive isotherm of enantiomers. *Journal of chromatography. A*, 986(2):207–225, 2003.
- [31] R. Arnell, P. Forssén, and T. Fornstedt. Accurate and rapid estimation of adsorption isotherms in liquid chromatography using the inverse method on plateaus. *Journal of Chromatography A*, 1099(1-2):167–174, 2005.
- [32] P. Forssen, R. Arnell, and T. Fornstedt. An improved algorithm for solving inverse problems in liquid chromatography. *Computers and Chemical Engineering*, 30(9):1381–1391, 2006.
- [33] R.P.W. Scott and P. Kucera. Solute solvent interactions on the surface of silica gel. II. *Journal of Chromatography A*, 171:37–48, 1979.
- [34] G.J. Burrell and R.J. Hurtubise. Solid surface luminescence interactions of nitrogen heterocycles adsorbed on silica gel chromatoplates submerged in chloroform/n-hexane solvents. *Analytical Chemistry*, 60(6):564–568, 1988.
- [35] D.U. Staerk, A. Shitangkoon, E. Winchester, G. Vigh, A. Felinger, and G. Guiochon. Use of the equilibrium-dispersive model of nonlinear gas chromatography for the

- modelling of the elution band profiles in the preparative scale gas chromatographic separation of enantiomers. *Journal of Chromatography A*, 734(2):289–296, 1996.
- [36] I. Quiñones, A. Cavazzini, and G. Guiochon. Adsorption equilibria and overloaded band profiles of basic drugs in a reversed-phase system. *Journal of Chromatography A*, 877(1-2):1–11, 2000.
- [37] F. Gritti and G. Guiochon. Adsorption mechanism in RPLC. Effect of the nature of the organic modifier. *Anal. Chem*, 77(13):4257–4272, 2005.
- [38] F. Gritti and G. Guiochon. Physical origin of peak tailing on C18-bonded silica in reversed-phase liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1028(1):75–88, 2004.
- [39] S. Bocian, P. Vajda, A. Felinger, and B. Buszewski. Solvent excess adsorption on the stationary phases for reversed-phase liquid chromatography with polar functional groups. *Journal of Chromatography A*, 2008.
- [40] A. Cavazzini, G. Nadalini, V. Malanchin, V. Costa, F. Dondi, and F. Gasparri. Adsorption Mechanisms in Normal-Phase Chromatography. Mobile-Phase Modifier Adsorption from Dilute Solutions and Displacement Effect. *Anal. Chem*, 79(10):3802–3809, 2007.
- [41] F. Gritti and G. Guiochon. Heterogeneity of the adsorption mechanism of low molecular weight compounds in reversed-phase liquid chromatography. *Analytical Chemistry*, 78:5823–5834, 2006.
- [42] F. Gritti and G. Guiochon. A chromatographic estimate of the degree of heterogeneity of rplc packing materials
1.non-encapped polymeric c_{30} -bonded stationary phase. *Journal of Chromatography A*, 1103:43–56, 2006.
- [43] J. Samuelsson, R. Arnell, and T. Fornstedt. Invisible Analyte Peak Deformations in Single-Component Liquid Chromatography. *Anal. Chem*, 78(8):2765–2771, 2006.

- [44] G.H. Findenegg in: F.Dondi, G. Guiochon, and M. Jaroniec. *Theoretical advancement in chromatography and related separation techniques*. Kluwer Academic Publishers, 1992.
- [45] F. Gritti, YV Kazakevich, and G. Guiochon. Effect of the surface coverage of endcapped C18-silica on the excess adsorption isotherms of commonly used organic solvents from water in reversed phase liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1169(1-2):111–124, 2007.
- [46] B. Buszewski, M. Jaroniec, and RK Gilpin. Influence of eluent composition on retention and selectivity of alkylamide phases under reversed-phase conditions. *Journal of chromatography*, 668(2):293–299, 1994.
- [47] A. Cavazzini, V. Costa, G. Nadalini, and F. Dondi. Instrumental method for automated on-line fraction analysis and peak deconvolution in multicomponent-overloaded high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1137(1):36–41, 2006.
- [48] H. Poppe, J. Paanakker, and M. Bronckhorst. Peak width in solvent-programmed chromatography:: I. General description of peak broadening in solvent-programmed elution. *Journal of Chromatography A*, 204:77–84, 1981.
- [49] U.D. Neue. Theory of peak capacity in gradient elution. *Journal of Chromatography A*, 1079(1-2):153–161, 2005.
- [50] U.D. Neue, D.H. Marchand, and L.R. Snyder. Peak compression in reversed-phase gradient elution. *Journal of Chromatography A*, 1111(1):32–39, 2006.
- [51] F. Gritti and G. Guiochon. The ultimate band compression factor in gradient elution chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1178(1-2):79–91, 2008.
- [52] L.R. Snyder, J.W. Dolan, and J.R. Gant. Gradient elution in high-performance liquid chromatography:: I. Theoretical basis for reversed-phase systems. *Journal of Chromatography A*, 165(1):3–30, 1979.

- [53] L.R. Snyder and J.W. Dolan. The linear-solvent-strength model of gradient elution. *Advances in chromatography(New York, NY)*, 38:115–187, 1998.
- [54] F. Gritti, A. Felinger, and G. Guiochon. Overloaded gradient elution chromatography on heterogeneous adsorbents in reversed-phase liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1017(1-2):45–61, 2003.
- [55] F.D. Antia and C. Horváth. Dependence of retention on the organic modifier concentration and multicomponent adsorption behavior in reversed-phase chromatography. *Journal of chromatography*, 550(1-2):411, 1991.
- [56] P. Jandera. Gradient Elution in Liquid Column Chromatography. Prediction of Retention and Optimization of Separation. *Advances In Chromatography*, page 1, 2004.
- [57] D.J. Winzor. Determination of binding constants by affinity chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1037(1-2):351–367, 2004.
- [58] A. Cavazzini, L. Pasti, F. Dondi, M. Finessi, V. Costa, F. Gasparrini, A. Ciogli, and F. Bedani. Binding of Dipeptides and Amino Acids to Teicoplanin Chiral Stationary Phase: Apparent Homogeneity of Some Heterogeneous Systems. *Analytical Chemistry*, 81:6735–6743, 2009.
- [59] I. D’Acquarica, F. Gasparrini, D. Misiti, C. Villani, A. Carotti, S. Cellamare, and S. Muck. Direct chromatographic resolution of carnitine and O-acylcarnitine enantiomers on a teicoplanin-bonded chiral stationary phase. *Journal of Chromatography A*, 857(1-2):145–155, 1999.
- [60] D.C. Schriemer. Biosensor alternative: frontal affinity chromatography. *Analytical chemistry(Washington, DC)*, 76(23):440–448, 2004.
- [61] L.W. Nichol, A.G. Ogston, D.J. Winzor, and W.H. Sawyer. Evaluation of equilibrium constants by affinity chromatography. *Biochemical Journal*, 143(2):435, 1974.

- [62] B.M. Dunn and I.M. Chaiken. Quantitative affinity chromatography. Determination of binding constants by elution with competitive inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 71(6):2382, 1974.
- [63] B.M. Dunn and I.M. Chaiken. Evaluation of quantitative affinity chromatography by comparison with kinetic and equilibrium dialysis methods for the analysis of nucleotide binding to staphylococcal nuclease. *Biochemistry*, 14(11):2343, 1975.
- [64] H.W. Hethcote and C. DeLisi. Determination of equilibrium and rate constants by affinity chromatography. *Journal of Chromatography A*, 248(2):183–202, 1982.
- [65] D.J. Winzor and W.H. Sawyer. *Quantitative characterization of ligand binding*. University of Texas Press, 1995.
- [66] J. Toth, W. Rudzinski, A. Waksmundzki, M. Jaroniek, and S. Sokolowski. Adsorption of gases on heterogeneous solid surfaces: the energy distribution function corresponding to a new equation for monolayer adsorption. *Acta Chimica Academiae Scientiarum Hungarica*, 82:11–21, 1974.
- [67] J.H. Boer. *The dynamical character of adsorption*. Clarendon Press, 1968.
- [68] I. D’Acquarica, F. Gasparri, D. Misiti, M. Pierini, and C. Villani. HPLC chiral stationary phases containing macrocyclic antibiotics: practical aspects and recognition mechanism. *Advances in chromatography*, 46:109–173, 2008.
- [69] D.W. Armstrong, Y. Tang, S. Chen, Y. Zhou, C. Bagwill, and J.R. Chen. Macrocyclic antibiotics as a new class of chiral selectors for liquid chromatography. *Analytical Chemistry*, 66(9):1473–1484, 1994.
- [70] D.H. Williams. The glycopeptide story—how to kill the deadly superbugs. *Natural Product Reports*, 13(6):469–477, 1996.
- [71] K.M. Gooding and F.E. Regnier. *HPLC of biological macromolecules*. CRC, 2002.

- [72] R.S. Blanquet, K.H. Bui, and D.W. Armstrong. Mechanistic considerations on the reversed phase liquid chromatographic separation of proteins. *Journal of liquid chromatography*, 9(9):1933–1949, 1986.
- [73] X. Liu, K. Kaczmarek, A. Cavazzini, P. Szabelski, D. Zhou, and G. Guiochon. Modeling of preparative reversed-phase HPLC of insulin. *Biotechnology progress*, 18(4):796–806, 2002.
- [74] O. Wintersteiner and H.A. Abramson. The isoelectric point of insulin. electrical properties of adsorbed and crystalline insulin. *The Journal of Biological Chemistry*, pages 741–753, 1932.
- [75] H. Lakhiari and D. Muller. Insulin adsorption on coated silica based supports grafted with N-acetylglucosamine by liquid affinity chromatography. *Journal of Chromatography B*, 808(1):35–41, 2004.
- [76] P. Cuatrecasas and Jacobs S. *Insulin*. Springer-Verlag, Berlin, 1990.
- [77] Y. Chen, AR Mehok, CT Mant, and RS Hodges. Optimum concentration of trifluoroacetic acid for reversed-phase liquid chromatography of peptides revisited. *Journal of Chromatography A*, 1043(1):9–18, 2004.
- [78] A.P. Ryle, F. Sanger, LF Smith, and R. Kitai. The disulphide bonds of insulin. *Biochemical Journal*, 60(4):541, 1955.
- [79] P.D. Jeffrey and J.H. Coates. An Equilibrium Ultracentrifuge Study of the Self-Association of Bovine Insulin. *Biochemistry*, 5(2):489–498, 1966.
- [80] P.D. Jeffrey and J.H. Coates. An equilibrium ultracentrifuge study of the effect of ionic strength on the self-association of bovine insulin. *Biochemistry*, 5:3820–3824, 1966.
- [81] W. Norde. Adsorption of proteins from solution at the solid-liquid interface. *Advances in Colloid and Interface Science*, 25:267–340, 1986.

- [82] K.M. Gooding and F.E. Regnier. *HPLC of biological macromolecules*. CRC, 2002.
- [83] A.P. Sabharwal and H. Chase. Preparative reverse-phase high performance liquid chromatography of insulin variants: characterization of adsorption isotherms by frontal analysis. *Food and Bioproducts Processing*, 77:18–26, 1999.
- [84] C.T. Mant and R.S. Hodges. Monitoring free silanols on reversed-phase supports with peptide standards. *Chromatographia*, 24(1):805–814, 1987.
- [85] D.W. Lee and B.Y. Cho. Investigation of the retention behavior and structural change of proteins in reversed phase and hydrophobic interaction chromatography. *Journal of liquid chromatography*, 17(12):2541–2558, 1994.
- [86] M. Al-Bokari, D. Cherrak, and G. Guiochon. Determination of the porosities of monolithic columns by inverse size-exclusion chromatography. *Journal of Chromatography A*, 975(2):275–284, 2002.
- [87] H.W. Hobart, L.L. Merritt Jr, J.A. Dean, and F.A. Settle Jr. Instrumental methods of analysis. *Editorial, Belmont, California*, 1988.
- [88] G. Guiochon and M. Martin. Theoretical investigation of the optimum particle size for the resolution of proteins by size-exclusion chromatography. *Journal of Chromatography A*, 326:3–32, 1985.
- [89] K. Miyabe and G. Guiochon. Characterization of monolithic columns for HPLC. *Journal of High Resolution Chromatography*, 27(10-11):853–873, 2004.
- [90] K.K. Unger, R. Skudas, and M.M. Schulte. Particle packed columns and monolithic columns in high-performance liquid chromatography-comparison and critical appraisal. *Journal of Chromatography A*, 1184(1-2):393–415, 2008.
- [91] A. Felinger. Deconvolution of overlapping skewed peaks. *Analytical Chemistry*, 66(19):3066–3072, 1994.
- [92] A. Felinger. *Data analysis and signal processing in chromatography*. Elsevier Science, 1998.

- [93] H. Poppe. Some reflections on speed and efficiency of modern chromatographic methods. *Journal of Chromatography A*, 778(1-2):3–21, 1997.
- [94] G. Desmet, D. Clicq, and P. Gzil. Geometry-independent plate height representation methods for the direct comparison of the kinetic performance of LC supports with a different size or morphology. *Analytical chemistry*, 77(13):4058, 2005.
- [95] S. Eeltink, G. Desmet, G. Vivó-Truyols, G.P. Rozing, P.J. Schoenmakers, and W.T. Kok. Performance limits of monolithic and packed capillary columns in high-performance liquid chromatography and capillary electrochromatography. *Journal of Chromatography A*, 1104(1-2):256–262, 2006.
- [96] S. Eeltink, W.M.C. Decrop, G.P. Rozing, P.J. Schoenmakers, and W.T. Kok. Comparison of the efficiency of microparticulate and monolithic capillary columns. *Journal of High Resolution Chromatography*, 27(17-18):1431–1440.
- [97] D. Cabooter, J. Billen, H. Terryn, F. Lynen, P. Sandra, and G. Desmet. Detailed characterisation of the flow resistance of commercial sub-2 μ m reversed-phase columns. *Journal of Chromatography A*, 1178(1-2):108–117, 2008.
- [98] F.C. Leinweber, D. Lubda, K. Cabrera, and U. Tallarek. Characterization of silica-based monoliths with bimodal pore size distribution. *Anal. Chem*, 74(11):2470–2477, 2002.
- [99] U. Tallarek, F.C. Leinweber, and A. Seidel-Morgenstern. Fluid dynamics in monolithic adsorbents: Phenomenological approach to equivalent particle dimensions. *Chemical Engineering & Technology*, 25(12):1177–1181, 2002.
- [100] G. Desmet, D. Clicq, T.T.N. Dao, D. Guillarme, S. Rudaz, J.L. Veuthey, N. Vervoort, G. Torok, D. Cabooter, and P. Gzil. Practical constraints in the kinetic plot representation of chromatographic performance data: Theory and application to experimental data. *Anal. Chem*, 78(7):2150–2162, 2006.

- [101] S. Eeltink, P. Gzil, W.T. Kok, P.J. Schoenmakers, and G. Desmet. Selection of comparison criteria and experimental conditions to evaluate the kinetic performance of monolithic and packed-bed columns. *Journal of Chromatography A*, 1130(1):108–114, 2006.
- [102] M. Dooley and B. Jarvis. Iomeprol: a review of its use as a contrast medium. *Drugs*, 59(5):1169–1186, 2000.
- [103] K.S. Boos and A. Rudolphi. The use of restricted-access media in HPLC, Part I. Classification and review. *LC GC*, 15(7):602–611, 1997.
- [104] A. Rudolphi and K.S. Boos. The use of restricted-access media in HPLC, Part II: Applications. *LC GC*, 15(9):814–823, 1997.
- [105] R.E. Majors, K.S. Boos, C.H. Grimm, D. Lubda, and G. Wieland. Practical guidelines for HPLC-integrated sample preparation using column switching. *LC GC*, 14(7):554–560, 1996.
- [106] J. Edelson, G. Palace, and G. Park. High-performance liquid chromatographic determination of iohexol in plasma, urine and feces. *Journal of chromatography*, 274:428–433, 1983.
- [107] V. Lorusso, I. Poggesi, D. Dal Fiume, and P. Tirone. High-performance liquid chromatographic assay of iomeprol in plasma and urine. *Journal of chromatography*, 525(2):401–409, 1990.
- [108] E. Brandstrom, A. Grzegorzcyk, L. Jacobsson, P. Friberg, A. Lindahl, and M. Aurell. GFR measurement with iohexol and ⁵¹Cr-EDTA. A comparison of the two favoured GFR markers in Europe. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 13(5):1176–1182, 1998.
- [109] P. Bourrinet, H. Feldman, A. Dencausse, C. Chambon, and B. Bonnemain. High-performance liquid chromatographic determination of iobitridol in plasma, urine

- and bile. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 670(2):369–372, 1995.
- [110] T. Arbughi, F. Bertani, R. Celeste, A. Grotti, and P. Tirone. High-performance liquid chromatographic determination of the X-ray imaging contrast agent, iofratol, in plasma and urine. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 701(1):103–113, 1997.
- [111] T. Arbughi, F. Bertani, R. Celeste, and P. Tirone. High-performance liquid chromatographic assay of the X-ray contrast agent iopiperidol in plasma and urine of rats and humans. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 729(1-2):323–332, 1999.
- [112] D. Farthing, D.A. Sica, I. Fakhry, T. Larus, S. Ghosh, C. Farthing, M. Vranian, and T. Gehr. Simple HPLC–UV method for determination of iohexol, iothalamate, p-aminohippuric acid and n-acetyl-p-aminohippuric acid in human plasma and urine with ERPF, GFR and ERPF/GFR ratio determination using colorimetric analysis. *Journal of Chromatography B*, 826(1-2):267–272, 2005.
- [113] R.S. Soman, H. Zahir, and F. Akhlaghi. Development and validation of an HPLC-UV method for determination of iohexol in human plasma. *Journal of Chromatography B*, 816(1-2):339–343, 2005.
- [114] E. Cavalier, E. Rozet, N. Dubois, C. Charlier, P. Hubert, J.P. Chapelle, J.M. Krzesinski, and P. Delanaye. Performance of iohexol determination in serum and urine by HPLC: Validation, risk and uncertainty assessment. *Clinica Chimica Acta*, 396:80–85, 2008.
- [115] E. Rozet, A. Ceccato, C. Hubert, E. Ziemons, R. Oprean, S. Rudaz, B. Boulanger, and P. Hubert. Analysis of recent pharmaceutical regulatory documents on analytical method validation. *Journal of Chromatography A*, 1158(1-2):111–125, 2007.

- [116] V.P. Shah, K.K. Midha, J.W.A. Findlay, H.M. Hill, J.D. Hulse, I.J. McGilve-ray, G. McKay, K.J. Miller, R.N. Patnaik, M.L. Powell, et al. Bioanalytical method validation: a revisit with a decade of progress. *Pharmaceutical Research*, 17(12):1551–1557, 2000.

Articoli allegati

1. A. Cavazzini, G. Nadalini, V. Costa, F. Dondi, Heterogeneity of adsorption mechanisms in chiral-normal phase liquid chromatography 2-Propanol and ethyl acetate adsorption equilibria, *Journal of Chromatography A*, 1143 (2007) 134-142.
2. A. Cavazzini, G. Nadalini, V. Malanchin, V. Costa, F. Dondi, and F. Gasparrini, Adsorption Mechanisms in Normal-Phase Chromatography. Mobile-Phase Modifier Adsorption from Dilute Solutions and Displacement Effect, *Analytical Chemistry*, 79 (2007), 3802-3809.
3. A. Cavazzini, L. Pasti, F. Dondi, M. Finessi, V. Costa, F. Gasparrini, A. Ciogli, and F. Bedani, Binding of Dipeptides and Amino Acids to Teicoplanin Chiral Stationary Phase: Apparent Homogeneity of Some Heterogeneous Systems, *Analytical Chemistry*, 81 (2009), 6735-6743
4. V. Costa, L. Pasti, N. Marchetti, F. Dondi, and A. Cavazzini, Automated instrumental method for on-line fraction analysis and peak deconvolution in gradient multicomponent overloaded high performance liquid chromatography, lavoro sottoposto a pubblicazione.

Heterogeneity of adsorption mechanisms in chiral normal-phase liquid chromatography

2-Propanol and ethyl acetate adsorption equilibria

Alberto Cavazzini*, Giorgio Nadalini, Valentina Costa, Francesco Dondi

Department of Chemistry, University of Ferrara, via L. Borsari 46, 44100 Ferrara, Italy

Received 1 November 2006; received in revised form 19 December 2006; accepted 22 December 2006

Available online 29 December 2006

Abstract

The adsorption equilibria of two commonly employed strong mobile phase modifiers, ethyl acetate and 2-propanol, on a polysaccharide-based chiral stationary phase have been studied by modeling nonlinear perturbation peaks measured after equilibration of the column with hexane (the weak component of the binary mixture). The investigation of adsorption processes from dilute solutions for species that are strongly retained on the stationary phase could be performed by this approach. On the opposite, limits of traditional linear perturbation technique for isotherm determination, in presence of strong interactions, have been evidenced. Alcohol adsorption has been modeled by a single Langmuir isotherm, while the ester has required a BiLangmuir model. These findings have found to be in a semi-quantitative agreement with available spectroscopic data about 2-propanol and ethyl acetate adsorption on thin silica sol–gel films in contact with a weak solvent. Experimental features observed for racemic separation on polysaccharide-based chiral stationary phases, such as the dependence of the separation factor on the amount and type of the employed additive, have been explained in light of these measurements.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Stationary phase heterogeneity; Cellulose-based immobilized chiral stationary phases; Excess isotherm; Isotherm determination; Strong mobile phase modifier adsorption; Adsorption mechanisms

1. Introduction

Geometric and energetic heterogeneity constitutes a fundamental feature of solid surfaces and are of great interest in the study of adsorption. Approaches to gather this information can be based on spectroscopic measurements such as, for instance, attenuated total internal reflection infrared spectroscopy, which has been recently proposed as an efficient technique to characterize adsorptive phenomena at silica/solution interfaces [1]. Chromatography can also be used to address this purpose. Indirect chromatographic measurements are based on the use of molecular probes, that is of opportunely derivatized species to exploit specific chemical moiety effects in the interactions with the stationary phase [2]. The limit of these applications is that they are usually confined to the linear range of adsorption isotherms

and, thus, do not permit the separation of different contributions to retention since retention factor includes the effects of all the interactions. The other chromatographic approach to investigate heterogeneity is via adsorption isotherm determination. Data afforded by nonlinear chromatography permit the separate estimates of the different interactions and the characterization of adsorption surface heterogeneity through equilibrium constant or binding energy distribution determination (from affinity energy distribution calculations or by equilibrium constant temperature dependence) [3–8]. Traditional chromatographic techniques for isotherm determinations lie on the overloading of the column by continuously pumping solutions at finite concentration. When these methods are used to investigate the adsorption of species that are strongly retained on the phase, one has to be aware that high-energetic (low abundance) sites are quickly saturated and detection of phenomena happening on them is critical unless extremely accurate measurements, particularly of the very initial part of the isotherm, are accomplished [9,10]. This is so, for instance, for alcohols in normal-phase (NP) conditions.

* Corresponding author. Fax: +39 0532 240709.

E-mail address: cvz@unife.it (A. Cavazzini).

In NP chromatography, polar solvents (the so-called strong modifiers or additives) are added to the mobile phase to control analyte retention. They may affect chromatographic separations through different mechanisms, such as competition for the adsorption on the stationary phase, by changing analyte solubility, or even through secondary equilibria formation (solute solvation, complex equilibria, etc.) [4,11–21]. In many practical cases, additive molecules are (largely) the most abundant species in the separative system. This is so, for instance, in chiral separation on cellulose-based chiral stationary phases (CSPs) for which the use of 5–15% (v/v) additive concentrations is recommended [22]. Mobile phase modifier adsorption equilibria should be, thus, carefully investigated to understand chromatographic separations in NP mode. In spite of this evidence, a common practice in chiral nonlinear chromatography is to measure enantiomer adsorption isotherms by dissolving the analytes in a mobile phase whose composition is identical to that will be employed during nonlinear separations [3,23–25]. Indeed, this is often forced by very large analyte retentions that would be observed in weak solvents. However, by doing so, the ternary system complexity is reduced to a binary separation, the effects associated to competitive adsorption of strong mobile phase modifiers being accounted for in (lumped) isotherm parameters [17]. As this approach can provide excellent description of band profiles under nonlinear conditions and serve as a base for optimization studies, it has the major limitation of not allowing for the investigation of additive adsorption that, under the working conditions, constantly saturates the stationary phase.

In this work, 2-propanol and ethyl acetate (EtOAc) adsorption equilibria on a cellulose-based (immobilized) CSP have been investigated by using an approach based on nonlinear perturbations. Since both the alcohol and the ester strongly interact with residual oxydrilic moieties present on the CSP, the traditional way of isotherm determination, based on linear perturbations [3,26–28], has been found to be critical to study these systems. The problem is the difficulty of performing and detecting linear perturbations from very dilute additive solutions in the weak solvent. The motivation for this study has arisen from previously observed features in the separation of a series of racemates on cellulose-based CSPs, such as the dependence of the chromatographic selectivity on the mobile phase composition, depending upon the use of specific additives. In particular, the selectivity factor was found to be unaffected by 2-propanol mobile phase amount while variations, as large as 20%, were observed with EtOAc [29].

2. Experimental

Solvents were HPLC grade. Hexane, 2-propanol and EtOAc were purchased from Riedel-de Haën (Seelze, Germany) and from Baker (Deventer, The Netherlands). Solvents were filtered before use with a Millipore apparatus (Billerica, MA, USA) and Supelco nylon-66 membrane filters with a 0.22 μm pore size (Bellefonte, PA, USA). The column employed for all the measurements was a 250 mm \times 4.6 mm stainless steel column packed with cellulose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate) immobilized on 20 μm silica particles (Chiralcel OD-I). A mod-

ular Jasco chromatograph (Easton, MD, USA) consisting of a PU-1580 intelligent HPLC pump, a LG-1580-02 ternary gradient unit (three-pump high-pressure system), a DG-980-50 3-line degasser and a refractive index (RI)-1530 intelligent refractive index detector was used. The system was interfaced to an Agilent 1100 series diode array detector (Palo Alto, CA, USA) placed downstream the RI detector. Injections were made by using a Rheodyne 7725i injector (Cotati, CA, USA).

Linear perturbations were performed through both hexane and mobile phase injections with a 0.5 μL injection loop. The retention volumes of the disturbances produced in these different manners were found to be coincident. Thirteen linear perturbations were recorded for the determination of the excess isotherms for both the alcohol and the ester. The mobile phase composition was changed by increasing additive concentration by 10% (v/v) in each step. In the low concentration regions of the adsorption isotherms, additional data were collected: in particular, points corresponding at 0, 3 and 5% (v/v) for EtOAc–hexane mixtures and points at 0.5, 2 and 5% (v/v) for 2-propanol–hexane mixtures. Nonlinear perturbations were performed by using 5, 20 and 100 μL loops. In these cases, EtOAc and 2-propanol were injected in a column equilibrated with hexane.

Flow rate was 1.0 mL/min. The temperature was 20.0 ± 0.2 °C (controlled by an Agilent 1100 Peltier unit). Extra-column volumes were systematically subtracted from experimental data before data elaboration. Column hold-up volume, V_0 , was evaluated through the so-called thermodynamic definition of dead volume [27]:

$$V_0 = \frac{\int_0^{C_{\max}} V_R(C) dC}{C_{\max}} \quad (1)$$

where the retention volume of linear disturbances, V_{RS} , are determined over the whole concentration range $[0-C_{\max}]$ (from pure weak component to 100% of strong modifier, see Section 4 for details). V_0 was found to be 2.98 mL (with both EtOAc and 2-propanol). The phase ratio F , Eq. (11), accordingly was 0.385.

3. Computation

All the calculation were performed on a Intel(R) Xeon(TM) CPU 3.06GHz Linux machine by using the GNU Fortran 77 compiler.

3.1. Excess isotherm calculation

Linear perturbation retention volume integration was carried out after experimental data interpolation through cubic spline (spline subroutine used for calculations was taken from Ref. [32]).

3.2. Nonlinear fitting procedures for detector calibration and inverse method calculations

RI detector calibration was performed through a nonlinear optimization approach based on mass balance considerations (namely, the fact that the injected amount has to be equal to the

eluted amount), that is

$$V_{\text{inj}} C_{\text{inj}} = \int Y(\mathbf{P}, C, V_R) dV_R \quad (2)$$

where V_{inj} and C_{inj} represent the injection volume and concentration, respectively; C is the mobile phase concentration; $Y(\mathbf{P}, C, V_R)$ is the signal in RI units and \mathbf{P} the vector of the parameters to be optimized. The following functional relationship between detector response and concentration was employed [30,31]:

$$Y(\mathbf{P}, C) = p_1 [1 - \exp(-p_2 C)] \quad (3)$$

where $\mathbf{P} = \{p_1, p_2\}$. Least square fitting was performed through Levenberg–Marquardt's method by using the subroutines described in Ref. [32].

An optimized simplex routine was employed for isotherm parameter optimization by inverse method [32,33].

3.3. Solution of the mass balance equation

The mass balance equation, Eq. (7), was solved by using a forward–backward difference scheme (Rouchon's algorithm). Typical boundary and initial conditions were employed [3].

3.4. Chi-square minimization

Measured and simulated band profiles were compared by minimizing the following objective function on normalized profiles (Chi-square):

$$\sum_i r_i^2 \Delta V = \sum_i (C_i^{\text{sim}} - C_i^{\text{meas}})^2 \Delta V \quad (4)$$

where C_i^{sim} and C_i^{meas} are the calculated and the measured concentrations at point i , r_i is their difference and ΔV the interval between sampled points.

4. Theory

Adsorption is an accumulation of one component in the proximity of an adsorptive surface due to the effect of surface forces. In binary liquid mixtures, accumulation of one component on (or near to) the surface causes the displacement of the other component to the bulk phase. At equilibrium, the local concentration of the adsorbed component near the surface will be greater than the bulk concentration (surface excess concentration, Γ). According to Everett, "the basic concept adopted [...] is that of an adsorbed phase (σ) close to, and under the influence of, the solid surface, and in equilibrium with the bulk solution. The adsorbed phase is usually supposed to be of uniform composition and autonomous in the sense that its property are controlled entirely by its interactions with the adjacent solid, but are unaffected by molecular interactions with the bulk liquid" [34]. By indicating with n^σ and x_i^σ , respectively, the total amount of material and the molar fraction of the i th component ($i = 1, 2$) in the adsorbed phase,

the (reduced) surface excess concentration is given by

$$\Gamma_i = \frac{(x_i^\sigma - x_i^1)n^\sigma}{A_s} = \frac{n_i^\sigma - x_i^1 n^\sigma}{A_s}, \quad i = 1, 2 \quad (5)$$

where $n_i^\sigma = (x_i^\sigma n^\sigma)$, x_i^1 is the molar fraction of the i th component in the bulk phase and A_s the surface area. (In liquid chromatography, data regarding stationary phase surface area are often not available.) This was so also in the present work. In these cases, the stationary phase volume, V_s , is employed in place of A_s for adsorption isotherm calculations [3,27,28]. The model described by Eq. (5) accounts for all features of experimental surface excess isotherms in dilute as well as concentrated solutions [35]. At low concentrations of the preferentially adsorbed component 2, $x_2^1 \ll 1$, through Eq. (5) one has

$$\Gamma_2 = \frac{n_2^\sigma}{A_s} \quad (6)$$

so that Γ_2 corresponds to the surface adsorbed concentration of component 2. In nonlinear chromatography, surface concentrations are commonly expressed as number of moles or grams per stationary phase volume unit (and indicated with q) [3]. When the bulk concentration of component 2 increases, the term $(x_2^1 n^\sigma)$ cannot be neglected compared to n_2^σ in Eq. (5): the excess concentration becomes smaller than n_2^σ/A_s . This depends on the fact that, becoming increasingly more difficult to allocate molecules on a finite surface already partially covered, n_2^σ increases more slowly than $x_2^1 n^\sigma$ or, said in another way, the bulk molar fraction of component 2 increases more than the corresponding adsorbed molar fraction. In this region, Γ_2 gets through a maximum. When n_2^σ reaches its limiting value (surface consisting entirely of component 2), Γ_2 becomes a linear decreasing function of x_2^1 with a slope of n^σ/A_s and intercept n_2^σ/A_s . This limiting equation has been extensively used to estimate maximum amounts adsorbed on stationary phases [4,19,21].

In order to model nonlinear chromatography, one needs physically realistic model isotherm equations for the adsorption from dilute solutions. These relationships, introduced in the differential mass balance equation that describes how material accumulates in an infinitesimal slice of a column due to convection and diffusion, serve to correlate concentrations in stationary phase to mobile phase concentrations at equilibrium. When the equilibrium dispersive model of chromatography is employed, the differential mass balance equation is written as

$$\frac{\partial C}{\partial t} + F \frac{\partial q}{\partial t} + u \frac{\partial C}{\partial z} = D_L \frac{\partial^2 C}{\partial z^2} \quad (7)$$

where q and C represent stationary phase and mobile phase concentration, respectively; t and z are the time elapsed from the injection and the distance traveled by the band along the column; u is the mobile phase linear velocity. D_L is an apparent dispersion coefficient that accounts for all nonequilibrium effects [3].

Among the other techniques for isotherm determination through chromatography, we mention here:

- (1) *Linear perturbation technique*. Basically, this method lies in the determination of retention volumes (V_R) of perturbation

peaks measured in a column equilibrated with streams of mobile phase of increasing concentration C' (from pure weak component to 100% of strong modifier). The theory of ideal nonlinear chromatography demonstrates that the retention volume of the perturbation peak measured at C' , $V_R(C')$, is related to the adsorption isotherm by [3,36,37]:

$$V_R(C') = V_0 + A_s \left. \frac{d\Gamma(C)}{dC} \right|_{C=C'} \quad (8)$$

where $\left. \frac{d\Gamma}{dC} \right|_{C=C'}$ is the slope of the isotherm at $C = C'$. Integration of Eq. (8) leads to

$$\Gamma(C^*) = \int_0^{C^*} \frac{V_R - V_0}{A_s} dC \quad (9)$$

which allows for excess adsorption isotherm calculation from empirical retention data of minor (linear) disturbance peaks [35]. Peak perturbations can be performed through pulse injections of mobile phase, vacancies or pure components. Their detection can be difficult if UV detectors are employed, since the use of wavelengths near to mobile phase component cutoffs (where the instrumental noise is elevated) is often necessary. RI detectors represent an useful alternative when detection (and interpretation) of perturbation signals is necessary [3].

- (2) *Inverse method.* Equilibrium adsorption information can be gathered through numerical methods. In the so-called inverse method (IM), an isotherm model is *a priori* chosen based on the shape of the experimental peaks measured under overloaded conditions. The best estimates of the isotherm parameters are calculated by minimizing the differences between experimental overloaded peaks and the corresponding simulated profiles, obtained by solving a model of nonlinear chromatography in which the assumed adsorption isotherm was introduced [32,36,38]. The agreement between empirical and simulated data represents the criterion for proper selection among different, but consistent, adsorption models (for instance, in the case of convex-upward isotherms, they could be: Langmuir, BiLangmuir, Tóth, Freundlich–Langmuir, etc.). Through this work, the expression “nonlinear perturbation approach” has been sometimes preferred to “inverse method”. This was done to emphasize the fact that, in order to investigate adsorption from dilute solutions, very small mobile phase modifier injections (5 or 20 μL on an analytical scale column) had to be performed, contrary to what is commonly done with IM [32].

5. Results and discussion

An interesting aspect that has been observed in NP chiral separations on CSPs is the dependence of the separation factor, α , on the additive amount and type. In the enantioseparation of a set of 14 racemic dihydropyrimidines on polysaccharide-based CSPs, for instance, α was found to be independent on the amount of 2-propanol in the mobile phase but changes as large as 20% were observed with EtOAc. On the other hand, the typical trend of NP separations, decreasing of retention by

increasing the amount of strong modifiers, was observed with both additives [29].

Retention of enantiomers arises due to several mechanisms, both bulk and interfacial, stereospecific (or selective) and nonstereospecific (nonselective). Selective interactions cause enantiomer differential migration. Under the hypothesis of a surface paved with i different kinds of adsorption sites (each of which corresponding to a specific retention mechanism) the retention factor can be written as [39]:

$$k' = \sum_i k'_i = F \sum_i a_i \quad (10)$$

where k'_i and a_i are, respectively, the retention factor and the adsorption Henry's constant for i th retention mechanism [40] and F is the phase ratio:

$$F = \frac{V_s}{V_0} \quad (11)$$

being V_s and V_0 the stationary phase and the hold-up volume [41]. Thus, for chiral separations on CSPs, Eq. (10) can be written as

$$k' = k'_{\text{sel}} + k'_{\text{ns}} = F(a_{\text{sel}} + a_{\text{ns}}) \quad (12)$$

where k'_{sel} and k'_{ns} include all selective (sel) and nonselective (ns) contributions to retention. Since, under linear conditions, these two terms cannot be deconvoluted [39], the conventional (apparent) separation factor accounts for both of them

$$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1} = \frac{k'_{\text{sel},2} + k'_{\text{ns}}}{k'_{\text{sel},1} + k'_{\text{ns}}} \quad (13)$$

the labels 1 and 2 referring to first and second eluted enantiomers.

In order to predict how α changes by changing the additive amount, a model for analyte and additive adsorption equilibria on the stationary phase is needed. Since there are no vacancies in the surface solution and the bulk solution, the number of molecules of a given component (X) in the surface phase may increase only by displacing an equivalent number of molecules of other components from this phase to the bulk phase [11,42,43]. Thus, by assuming a CSP composed by selective and nonselective adsorption sites, the adsorption on stereospecific sites can be represented as



where Z represents the strong additive. For nonselective sites, over which enantiomers behave identically, one has



Eqs. (14)–(16) correspond to the BiLangmuir adsorption type, which is possibly the most often employed model to describe chiral separations [3]. In some cases, nevertheless, the simpler Langmuir isotherm (homogeneous model) has been also used for this purpose [23,44]. By doing so, an important simplification is assumed that nonselective interactions have a negligible contribution to retention (which corresponds to omit Eq. (16)):

the energies of all possible enantioselective interactions are assumed to be close enough to be averaged to a single adsorption energy and a single adsorption constant for each enantiomer.

Let us consider how α can be expressed when Langmuir or BiLangmuir adsorption behaviors are assumed. Since trace amounts of enantiomers were injected, their competitive Langmuir isotherm can be written as (see Appendix A for details):

$$\theta_i = \frac{q_i}{q_s} = K_i (1 - \theta_Z) C_i, \quad i = 1, 2 \quad (17)$$

where θ_i and K_i represent the surface coverage and the adsorption equilibrium constant of the i th enantiomer, q_s is the saturation capacity (assumed to be the same for the two components [3]) and θ_Z the surface coverage of the strong mobile phase modifier:

$$\theta_Z = \frac{K_Z C_Z}{1 + \sum_{i=1}^2 K_i C_i + K_Z C_Z} \quad (18)$$

being K_Z the additive adsorption equilibrium constant and C_Z its mobile phase concentration. Therefore, through Eqs. (12) and (13) (in which a_{ns} and k_{ns} were neglected):

$$\alpha = \frac{q_s(1 - \theta_Z)K_2}{q_s(1 - \theta_Z)K_1} = \frac{K_2}{K_1} \quad (19)$$

that states that the separation factor is constant and independent on mobile phase additive amount. In the case of a BiLangmuir isotherm, the surface coverage for the i th species at infinite dilution is (see Appendix A):

$$\theta_i = \frac{q_i}{q_s} = K_{sel,i}(1 - \theta_{Z_{sel}})C_i + K_{ns}(1 - \theta_{Z_{ns}})C_i, \quad i = 1, 2 \quad (20)$$

where $K_{sel,i}$ is the equilibrium adsorption constant for the i th enantiomer on selective sites and K_{ns} that on nonselective sites. $\theta_{Z_{sel}}$ and $\theta_{Z_{ns}}$ represent strong mobile phase modifier surface coverages on selective and nonselective CSP portions, respectively. Thus, mobile phase additive adsorption isotherm can be written in a compact way as (see Eq. (18)):

$$\theta_Z = \theta_{Z_{sel}} + \theta_{Z_{ns}} \quad (21)$$

Finally, by using Eqs. (12) and (13), α becomes:

$$\alpha = \frac{(1 - \theta_{Z_{sel}})K_{sel,2} + (1 - \theta_{Z_{ns}})K_{ns}}{(1 - \theta_{Z_{sel}})K_{sel,1} + (1 - \theta_{Z_{ns}})K_{ns}} \quad (22)$$

and, since $\theta_{Z_{sel}}$ and $\theta_{Z_{ns}}$ are function of C_Z , α is expected to change if the amount of the strong mobile phase modifier in the system changes.

As it was mentioned, on cellulose-based CSPs, α changes (up to 20%) were observed with EtOAc, while no variation was found with 2-propanol [29]. These findings are consistent with the assumption of a quasi-homogeneous adsorption behavior (Langmuir model, Eq. (19)) for the alcohol on the CSP, while to explain α dependence on EtOAc amount an heterogeneous isotherm is necessary (Eq. (22)). In the adsorption of different species, surface heterogeneity is different since adsorption energies are composed of a mixture of specific interactions with the adsorptive material (Eq. (10)) [23,45]. 2-Propanol

and EtOAc have different hydrogen-bond characteristics. 2-Propanol can act both as an hydrogen-bond donor and acceptor. EtOAc, instead, is simply an hydrogen-bond acceptor. On the other hand, the CSP presents strong hydrogen-bond donor properties through both residual silanol groups on the silica gel and cellulose underivatized oxydrilic moieties. Additionally, it has a weaker hydrogen-bond donor attitude via carbamic moieties [29]. EtOAc hydrogen-bond acceptor characteristics have been demonstrated to be extremely sensitive to differences in hydrogen-bond acidity. Thus, OH and NH moieties on the CSP would be responsible for EtOAc adsorption heterogeneity. On the contrary, the amphophilic nature of 2-propanol would exercise a leveling effect leading to differences in adsorption energies of the two sites that are not detectable [1].

To bolster these hypotheses mobile phase additive adsorption isotherms have been measured by two different approaches: the (traditional) linear perturbation technique and an approach based on nonlinear perturbations. In the upper part of Fig. 1, EtOAc perturbation retention volumes are plotted against the mobile phase composition (expressed as strong mobile phase modifier molar fraction). For the sake of clarity, disturbance retention volumes corresponding to the smallest investigated concentrations are indicated with arrows. For EtOAc, these have been at 0 and 3% (v/v) (Fig. 1, top). Determination of the perturbation peak at zero modifier concentration is, at least in theory, a very simple measurement. It requires an injection of an EtOAc pulse in a column equilibrated with hexane. From an experimental point of view, however, things are complicated by the difficulty of performing injections truly belonging to the linear region of the adsorption isotherm. This has been demonstrated in Fig. 2, where four chromatograms for increasingly reduced EtOAc injections are represented (nonlinear perturbation peaks). EtOAc amount ranges from about 1 mmole (pure EtOAc 100 μ L injection, dotted line) to roughly 5×10^{-4} mmoles (hexane:EtOAc 99:1% (v/v) 5 μ L injection, continuous line). The limited RI detector sensitivity made it impossible to inject smaller quantities (the intensity of the signal represented with the continuous line in Fig. 2 has been enlarged by a factor 10). Apart for negative intensities, profile shapes correspond to the typical forms expected for langmuirian-type isotherms under nonlinear conditions: overloaded peak shocks going to larger retention volumes by decreasing column loading (100 μ L injection caused detector saturation and this is why peak apex is truncated in this case). By considering the limit at infinite dilution, the chromatographic signal is expected to move towards the very end of overloaded profile tails [3]. A value equal to 10 mL has been obtained as the retention volume of EtOAc in the weak solvent by an approach, based on the interpretation of nonlinear perturbations, that will be discussed in detail later on. Nevertheless, this point has been included in both Figs. 1 and 2 (indicated as “extrapolated”). The peak labeled “ V_R infinite dilution” in Fig. 2 can be, instead, considered as the best experimental estimation of the perturbation volume at $x_{EtOAc}^1 = 0$ (that is the “0.0” point indicated in Fig. 1), even though its shape is characterized by a pronounced asymmetry (of thermodynamical origin as it will be later demonstrated). The bottom of Fig. 1 shows two excess isotherms for EtOAc: the former (first series) was calculated by

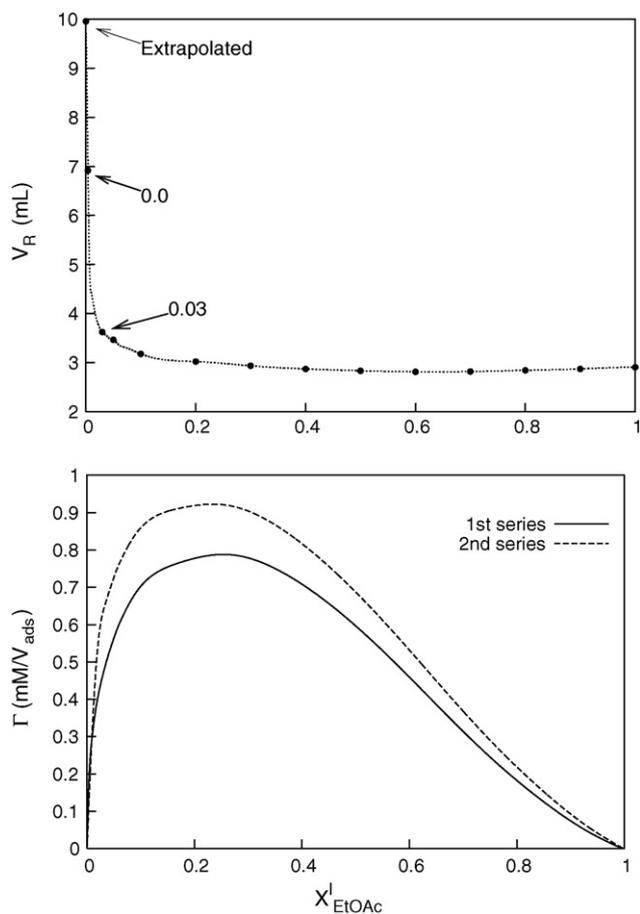


Fig. 1. (Top) EtOAc linear perturbation retention volumes plotted vs. ester molar fraction. Arrows indicate perturbation retention volumes measured at specific mobile phase compositions. The “extrapolated” point was obtained through nonlinear perturbations (see text for details). (Bottom) Effect of excluding (first series) or including (second series) the extrapolated point from perturbation data for excess isotherm calculation.

merely considering linear perturbation data (i.e. data of Fig. 1 with the exclusion of the extrapolated point); for the latter (second series), the point at 10 mL was included. The shapes of the two isotherms are different, so are the positions of their maxima. It is worth to observe that excess isotherm regions where Γ is a linear decreasing function of the strong mobile phase additive are employed to extrapolate information regarding adsorbed surface concentrations, once a model for the adsorbed layer structure is assumed [4,20,21]. The presented calculations show how critical can be to obtain this information, via linear perturbation data, for species that strongly interact with the surface due to the difficulty of accurately investigating adsorption isotherm initial regions.

An even more complex situation was encountered with 2-propanol (Figs. 3 and 4). In this case, in fact, V_R at zero modifier concentration was not experimentally detectable. The reason was an unfavorable signal-to-noise ratio caused by the extremely elevated 2-propanol retention in the weak component originated by alcohol strong interactions with the bare surface. The top of Fig. 3 represents 2-propanol perturbation retention volumes plotted against alcohol molar fraction. Fig. 4, instead, shows the series of nonlinear perturbations measured in this case. Their

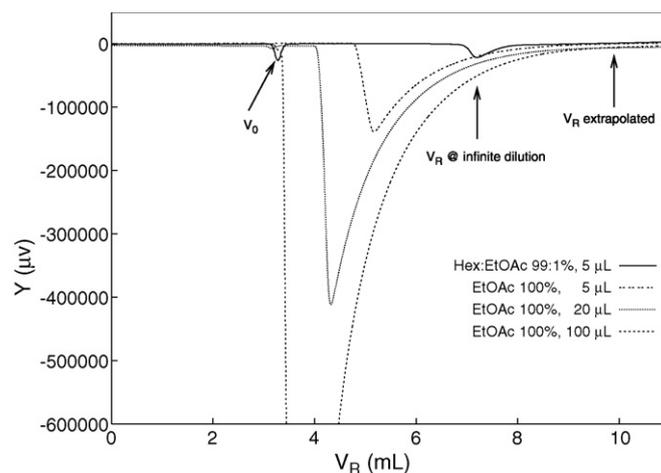


Fig. 2. EtOAc nonlinear perturbations. V_0 : hold-up volume; V_R -@-infinite-dilution: best empirical estimate of retention volume at infinite dilution by linear perturbations; V_R -extrapolated: retention volume at infinite dilution extrapolated through nonlinear perturbations. The intensity of the chromatogram for hexane:EtOAc 99:1% (v/v) 5 μ L injection (continuous line) has been enlarged 10 times in the figure. Key: mobile phase composition, injected volume. RI detector signal in μ V.

peak shapes indicate the existence, also for 2-propanol, of a langmuirian-type adsorption (as for EtOAc, 100 μ L injection caused detector saturation). By considering the behavior at infinite dilution, one may expect V_R to be larger than 40 mL. The value indicated in Fig. 4 (and even in Fig. 3) is 42 mL that, as for EtOAc, was extrapolated by nonlinear perturbation modeling (see later on). The bottom part of Fig. 3 shows 2-propanol excess adsorption isotherms calculated by excluding (first data set) or considering (second data set) the extrapolated point. In this case, the maximum of the plot corresponding to second data set is almost twice as large as that for the first series. This is a consequence of the steepness of retention volume perturbation plot near to zero concentration, which reflects the strongest interaction of the alcohol with the bare surface. These findings once again confirm that, for species that strongly interact with the surface, linear perturbation data are critical for the characterization of the adsorption process.

On the one hand, then, adsorption from diluted solutions is the key to understand 2-propanol and EtOAc adsorption behaviors on the cellulose-based CSP. On the other hand, traditional linear perturbation measurements do not seem able to provide information on this isotherm region, as it will be further demonstrated. To investigate EtOAc and 2-propanol adsorption, from diluted solutions of the alcohol and the ester in the weak solvent, an approach based on nonlinear perturbations has been developed. It basically consists of measuring a set of strong mobile phase modifier nonlinear perturbations on a column equilibrated with the weak component (peaks in Figs. 2 and 4). The IM is, then, used to obtain the best isotherm parameters. The first step necessary to perform IM calculations requires the conversion of chromatographic signals from RI unit to concentration [32]. Detector calibration was performed through the procedure described under Section 3. Experimental signals corresponding to 5 and 20 μ L injections, transformed in concentration units,

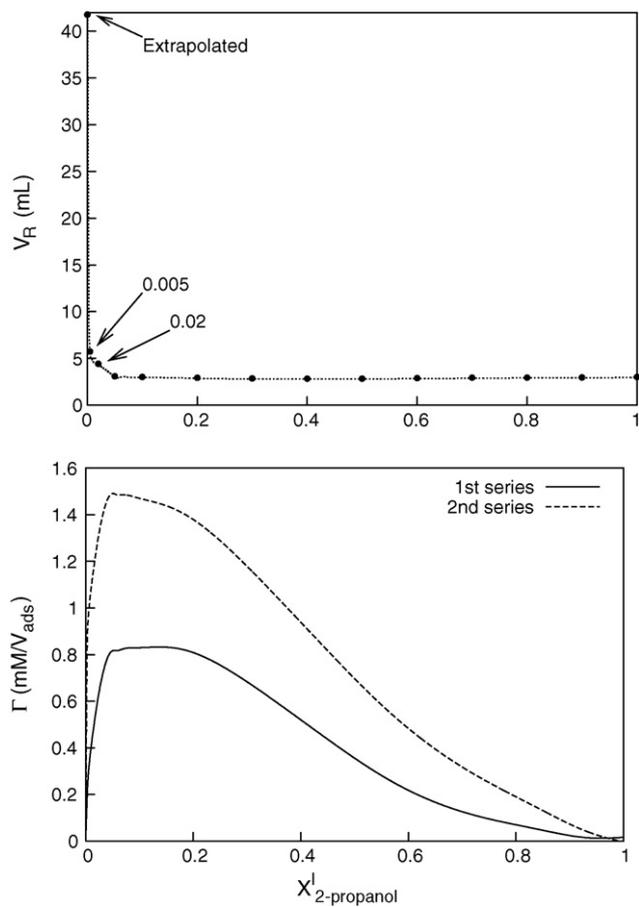


Fig. 3. (Top) 2-Propanol linear perturbation retention volumes plotted vs. alcohol molar fraction. Arrows indicate perturbation retention volumes corresponding to specific mobile phase compositions. The “extrapolated” point was obtained through nonlinear perturbations. (Bottom) Effect of excluding (first series) or including (second series) the extrapolated point from perturbation data for excess isotherm calculation (see text for details).

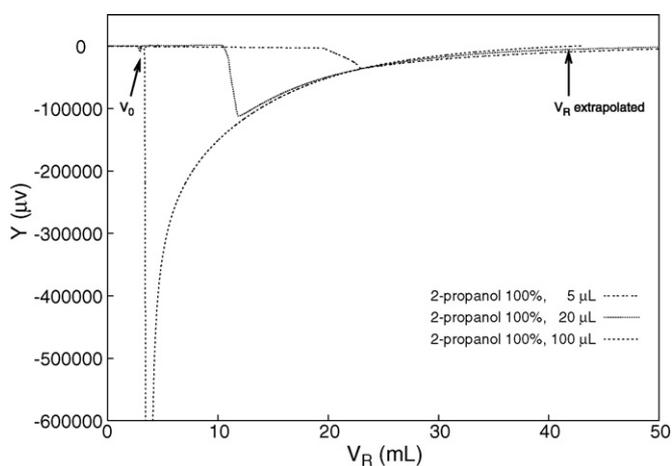


Fig. 4. 2-Propanol nonlinear perturbations. V_0 : hold-up volume; V_R -extrapolated: retention volume at infinite dilution extrapolated through nonlinear perturbations. Key: mobile phase composition, injected volume. RI detector signal in μV .

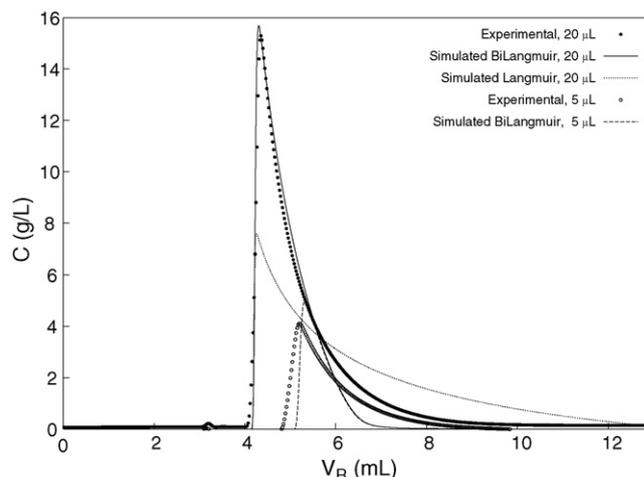


Fig. 5. EtOAc experimental profiles vs. simulations for different experimental conditions (injection volumes: 5 and 20 μL). For the 20 μL injection, Langmuir model simulation results (dotted line) are compared with those obtained by a BiLangmuir isotherm (continuous line).

are represented with points in Figs. 5 and 6 for EtOAc and 2-propanol, respectively. To determine the best isotherm parameters through IM calculations, 20 μL injections were used. In the framework of this theory, this is important since the larger the amount injected the wider the concentration range over which the accuracy of thermodynamic information obtained via IM is elevated [32,36]. In Table 1 (first column) the best isotherm parameters for EtOAc are reported. In Fig. 5, the blue line shows EtOAc simulated profile when the simple Langmuir isotherm was employed to solve Eq. (7). The agreement between experimental and simulated peaks is substantially unacceptable in this case showing that a Langmuir model is not adequate to account for the experimental data [3]. In this same figure, the red line refers to the simulation for a BiLangmuir adsorption isotherm. The significant fitting improvement achieved in this case (especially for that which concerns the shock layer position) indicates that an heterogeneous model is needed to describe EtOAc adsorption. The same isotherm model (BiLangmuir) and parameters were then employed to simulate an EtOAc 5 μL injection (Fig. 5, dashed line). Admittedly, in both cases, the comparison between experimental and simulated peaks shows that the BiLangmuir isotherm cannot accurately describe the elongated tails characteristic of experimental profiles. This can be due to the fact that the simple equilibrium dispersive model of chromatography (Eq. (7)) has been employed for calculations, which does not account for any mass transfer effects [3]. Moreover, the BiLangmuir isotherm is an ideal heterogeneous adsorption model, far from being a realistic description of adsorptive surface complexity. Having said this, however, the different results obtained with a Langmuir or a BiLangmuir model cannot be neglected. Additionally, these results are strengthened by existing spectroscopic data regarding EtOAc adsorption on silica gel [1] (see later on) and by comparison with 2-propanol results that will be considered now.

In Fig. 6, the comparisons between calculated and experimental data for different injected volumes of 2-propanol are shown. In this case, surprisingly, a simple Langmuir model (Table 1,

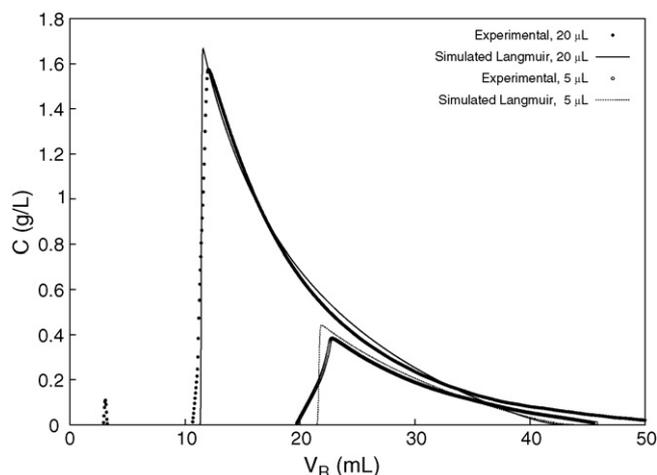


Fig. 6. Comparison between 2-propanol experimental profiles and simulated peaks obtained by using a Langmuir adsorption isotherm (injection volumes: 5 and 20 μL).

second column) has been found to be able to describe alcohol adsorption equilibria, as evidenced by the noticeable agreement between empirical and simulated profiles (apart for the elongated tails, to which the same considerations as for EtOAc apply). To further support data interpretation, a simple Chi-square analysis was used to compare the results obtained for the alcohol and the ester. For EtOAc, the Chi-square value (calculated on normalized profiles, see Section 3) for a BiLangmuir model (0.056) was significantly lower than that for a Langmuir isotherm (0.52). For 2-propanol, the Chi-square for the Langmuir isotherm had a comparable value (0.053) with the best value obtained for EtOAc. This is why no other adsorption models have been considered for 2-propanol. Through isotherm parameters (Table 1) it is possible to calculate the expected retention volumes of alcohol and ester linear injections in the weak solvent (Eq. (8)). One gets 42 and 10 mL for 2-propanol and EtOAc, respectively. This explains the 2-propanol extrapolated value (42 mL, Figs. 3 and 4) and confirms that EtOAc retention volume at infinite dilution obtained by linear perturbations (Fig. 1, “0.0” point) was underestimated.

As a conclusive remark, a comparison can be made between these chromatographic measurements and spectroscopic data available in literature. By investigating 2-propanol and EtOAc adsorption equilibria on thin silica sol-gel films in contact with heptane solutions via Attenuated Total Internal Reflection Infrared Spectroscopy, Rivera et al. [1] demonstrated that alcohol

adsorption was best modeled by a simple Langmuir isotherm while for the ester a BiLangmuir isotherm was found. It is worth to observe that two different approaches, spectroscopic- and thermodynamic-based, lead to similar conclusions. The comparison can be made more quantitative by considering adsorption equilibrium constant values achieved in the two cases. Based on spectroscopic data, strong and the weak adsorption constants were for EtOAc (at 293 K) $14 \pm 6 \times 10^2$ and $1.6 \pm 3 \times 10^2$ (mole fraction) $^{-1}$, respectively. For 2-propanol, a constant of $28.6 \pm 2 \times 10^2$ (mole fraction) $^{-1}$ was obtained. By transforming the equilibrium constants reported in Table 1, from (L/g) to (mole fraction) $^{-1}$, the following values can be calculated (at 293 K and by assuming a density solution equal to 0.658 kg/L, that is hexane density): 1.6×10^2 and 0.2×10^2 for EtOAc and 3.6×10^2 for 2-propanol. There is, thus, roughly an order of magnitude difference between the constants achieved by the two approaches. In light of the experimental difficulties of these measurements and the differences between the two systems, these results seem to demonstrate that the approach based on nonlinear perturbations can provide useful information to study adsorption phenomena of species that, strongly interacting with adsorptive surfaces, are difficult to characterize.

6. Conclusions

In this work an approach based on nonlinear perturbations has been proposed to investigate EtOAc and 2-propanol adsorption equilibria on a polysaccharide-based CSP in NP mode. This technique, built on Inverse Method calculations, has been proven to be able to characterize adsorption phenomena occurring on high-energetic sites present on the surface. The traditional approach for isotherm determination, based on linear perturbations, on the contrary, has been found to be unadapted for these kind of studies.

2-Propanol adsorption has been best modeled through a simple Langmuir isotherm, while EtOAc has needed an heterogeneous BiLangmuir model. The information gathered by chromatographic investigation has been found to be consistent with spectroscopic data, published in literature, regarding alcohol and ester adsorption on polar surfaces under NP conditions. Within limits of experimental errors, the numerical values of the equilibrium constants obtained with the two approaches were comparable.

The approach based on nonlinear perturbations seems to be suitable to investigate other kinds of surface heterogeneity, such as for instance that coming from residual free silanols present on phases commonly employed in reversed-phase liquid chromatography (work in progress).

Acknowledgments

This work was supported by the Italian University and Scientific Research Ministry (2005037725_002) and by the University of Ferrara (ex-60%). Authors acknowledge Dr. T. Zhang (Chiral Technologies Europe, Illkirch Cedex, France) for the generous gift of the column employed in this work and Prof. A. Medici (University of Ferrara) for RI detector loan.

Table 1

Adsorption isotherm parameters obtained through nonlinear perturbation approach: BiLangmuir model ($q = a_1C/(1 + K_1C) + a_{II}C/(1 + k_{II}C)$) for EtOAc; Langmuir isotherm ($q = aC/(1 + KC)$) for 2-propanol

EtOAc	
a_1	3.1
K_1 (L/g)	23.2
a_{II}	2.8
K_{II} (L/g)	0.04
2-Propanol	
a	33.0
K (L/g)	0.8

Appendix A

The system described by Eqs. (14)–(16) is a three-component system, composed by the two enantiomers and the strong mobile phase additive. Accordingly, the adsorption isotherms of the species involved in these equilibria are competitive relationships. For the enantiomers one has

$$\theta_1 = \frac{q_1}{q_s} = \frac{K_1 C_1 (1 - \theta_Z - \theta_2)}{1 + K_1 C_1} \quad (23)$$

$$\theta_2 = \frac{q_2}{q_s} = \frac{K_2 C_2 (1 - \theta_Z - \theta_1)}{1 + K_2 C_2} \quad (24)$$

and since trace amounts were injected ($\theta_i \ll \theta_Z$, $i = 1, 2$):

$$\theta_i = \frac{q_i}{q_s} = \frac{K_i C_i (1 - \theta_Z)}{1 + K_i C_i}, \quad i = 1, 2 \quad (25)$$

For $C_i \rightarrow 0$, from Eq. (25) one obtains Eq. (17). For the strong mobile phase modifier, instead, the system is constantly under nonlinear conditions (Eq. (18)). Incidentally, one may observe that using Eqs. (23) and (24) and Eq. (18) is identical to use Eq. (18) and the traditional expression for the competitive adsorption isotherm [3]:

$$q_i = \frac{q_s K_i C_i}{1 + K_1 C_1 + K_2 C_2 + K_Z C_Z}, \quad i = 1, 2 \quad (26)$$

as it can be easily demonstrated by introducing in Eqs. (23) and (24) the pertinent θ_i ($= q_i/q_s$) expressions obtained from Eqs. (26) and (18).

Essentially, the BiLangmuir isotherm is the sum of two langmuirian terms. In the case of competitive equilibria, from

$$\theta_1 = \frac{q_1}{q_s} = \frac{K_{\text{sel},1} C_1 (1 - \theta_{2,\text{sel}} - \theta_{Z,\text{sel}})}{1 + K_{\text{sel},1} C_1} + \frac{K_{\text{ns}} C_1 (1 - \theta_{2,\text{ns}} - \theta_{Z,\text{ns}})}{1 + K_{\text{ns}} C_1} \quad (27)$$

$$\theta_2 = \frac{q_2}{q_s} = \frac{K_{\text{sel},2} C_2 (1 - \theta_{1,\text{sel}} - \theta_{Z,\text{sel}})}{1 + K_{\text{sel},2} C_2} + \frac{K_{\text{ns}} C_2 (1 - \theta_{1,\text{ns}} - \theta_{Z,\text{ns}})}{1 + K_{\text{ns}} C_2} \quad (28)$$

and considering that, for infinite diluted solutions, $\theta_{i,\text{sel}} \ll \theta_{Z,\text{sel}}$ and $\theta_{i,\text{ns}} \ll \theta_{Z,\text{ns}}$ (for $i = 1, 2$) Eq. (20) is obtained.

References

- [1] D. Rivera, P.E. Poston, R.H. Uibel, J.M. Harris, *Anal. Chem.* 72 (2000) 1543.
- [2] R.L. Snyder, *J. Chromatogr.* 255 (1983) 3.
- [3] G. Guiochon, A. Felinger, D.G. Shirazi, A. Katti, *Fundamentals of Preparative and Nonlinear Chromatography*, 2nd ed., Elsevier Academic Press, Amsterdam, 2006.
- [4] F. Gritti, G. Guiochon, *Anal. Chem.* 77 (2005) 4257.
- [5] R.P.W. Scott, P. Kucera, *J. Chromatogr.* 171 (1979) 37.
- [6] G.J. Burrell, R.J. Hurtubise, *Anal. Chem.* 60 (1988) 564.
- [7] I. Quiñones, A. Cavazzini, G. Guiochon, *J. Chromatogr. A* 877 (2000) 1.
- [8] D.U. Staerk, A. Shitangkoon, E. Winchester, G. Vigh, A. Felinger, G. Guiochon, *J. Chromatogr. A* 734 (1996) 289.
- [9] F. Gritti, G. Guiochon, *J. Chromatogr. A* 1028 (2004) 105.
- [10] A. Felinger, *J. Chromatogr. A* 1126 (2006) 120.
- [11] E. Soczewiński, *Anal. Chem.* 41 (1969) 179.
- [12] M. Jaroniec, D.E. Martire, *J. Chromatogr.* 351 (1986) 1.
- [13] L.R. Snyder, in: E. Heftmann (ed.), *Chromatography—Fundamentals and Applications of Chromatography and Related Differential Migration Methods. Part A. Fundamentals and Techniques* (Journal of Chromatography Library, vol. 51A), 5th ed., Elsevier, Amsterdam, 1992, pp. A1–A168.
- [14] A. Wang, P.W. Carr, *J. Chromatogr. A* 965 (2002) 3.
- [15] P. Nikitas, A. Pappa-Louisi, P. Agrafiotou, *J. Chromatogr. A* 946 (2002) 9.
- [16] J. Ko, J.C. Ford, *J. Chromatogr. A* 913 (2001) 3.
- [17] I. Poplewska, D. Antos, *Chem. Eng. Sci.* 60 (2005) 1411.
- [18] S.J. Klatt, T.L. Beck, *J. Phys. Chem.* 100 (1996) 5931.
- [19] F. Chan, L.S. Yeung, R. LoBrutto, Y.V. Kazakevich, *J. Chromatogr. A* 1082 (2005) 158.
- [20] F. Chan, L.S. Yeung, R. LoBrutto, Y.V. Kazakevich, *J. Chromatogr. A* 1069 (2005) 217.
- [21] Y.V. Kazakevich, R. LoBrutto, F. Chan, T. Patel, *J. Chromatogr. A* 913 (2001) 75.
- [22] C.T. Europe, www.chiral.fr.
- [23] A. Cavazzini, K. Kaczmarek, P. Szabelski, D.M. Zhou, X.D. Liu, G. Guiochon, *Anal. Chem.* 73 (2001) 5704.
- [24] A. Cavazzini, F. Dondi, S. Marmai, E. Minghini, A. Massi, C. Villani, R. Rompietti, F. Gasparrini, *Anal. Chem.* 77 (2005) 3113.
- [25] A. Cavazzini, A. Massi, G. Bergamaschi, S. Braga, F. Dondi, F. Dondoni, *Biotechnol. Progr.* 20 (2004) 603.
- [26] D. DeVault, *J. Am. Chem. Soc.* 65 (1943) 532.
- [27] Y.V. Kazakevich, H.M. McNair, *J. Chromatogr. Sci.* 31 (1993) 317.
- [28] Y.V. Kazakevich, H.M. McNair, *J. Chromatogr. Sci.* 33 (1995) 321.
- [29] G. Nadalini, F. Dondi, A. Massi, A. Dondoni, T. Zhang, A. Cavazzini, *J. Chromatogr. A* 1126 (2006) 357.
- [30] R. Ghazy, B. El-Baradie, A. El-Shaer, F. El-Mekawey, *Opt. Laser Technol.* 31 (1999) 335.
- [31] M. Fukuta, T. Yanagisawa, S. Miyamura, Y. Ogi, *Int. J. Refrigeration* 27 (2004) 346.
- [32] A. Felinger, A. Cavazzini, G. Guiochon, *J. Chromatogr. A* 986 (2003) 207.
- [33] E. Morgan, K.W. Burton, *Chemom. Intel. Lab. Syst.* 8 (1990) 97.
- [34] D.H. Everett, *Colloid Science (Specialist Periodical Reports, vol. 1)*, Chemical Society, London, 1973, p. 49.
- [35] G.H. Findenegg, in: F. Dondi, G. Guiochon (Eds.), *Theoretical Advancement in Chromatography and Related Separation Techniques (NATO ASI Series C, vol. 383)*, Kluwer, Dordrecht, 1992, pp. 227–260.
- [36] A. Cavazzini, A. Felinger, G. Guiochon, *J. Chromatogr. A* 1012 (2003) 139.
- [37] F. Riedo, E.S. Kováts, *J. Chromatogr.* 239 (1982) 1.
- [38] A. Felinger, D.M. Zhou, G. Guiochon, *J. Chromatogr. A* 1005 (2003) 35.
- [39] G. Götmár, B.J. Stanley, T. Fornstedt, G. Guiochon, *Langmuir* 19 (2003) 6950.
- [40] D.M. Ruthven, *Principles of Adsorption and Adsorption Processes*, Wiley, New York, 1984.
- [41] J.C. Giddings, *Unified Separation Science*, Wiley–Interscience, New York, 1991.
- [42] L.R. Snyder, M.A. Stadalius, C. Horváth (Eds.), *High-performance Liquid Chromatography: Advances and Perspectives, vol. 2*, Academic Press, New York, 1986.
- [43] L.R. Snyder, *Principles of Adsorption Chromatography*, Dekker, New York, 1968.
- [44] S. Khatibi, D.E. Cherrack, J. Fisher, P. Jandera, G. Guiochon, *J. Chromatogr. A* 877 (2000) 95.
- [45] F. Gritti, A. Felinger, G. Guiochon, *J. Chromatogr. A* 1017 (2003) 45.

Adsorption Mechanisms in Normal-Phase Chromatography. Mobile-Phase Modifier Adsorption from Dilute Solutions and Displacement Effect

Alberto Cavazzini,^{*,†} Giorgio Nadalini,[†] Vivienne Malanchin,[†] Valentina Costa,[†] Francesco Dondi,[†] and Francesco Gasparrini[‡]

Department of Chemistry, University of Ferrara, via L. Borsari 46, 44100 Ferrara, Italy, and Dipartimento di Studi di Chimica e Tecnologia delle Sostanze Biologicamente Attive, Università degli Studi di Roma, "La Sapienza", P.le A. Moro 5, I-00185 Roma, Italy

The adsorption equilibria of methanol from diluted solutions of the alcohol in dichloromethane (the weak solvent of the binary mixture) have been investigated in normal-phase conditions on an hybrid polymeric chiral stationary phase. This was done by analyzing the shapes of nonlinear perturbations of methanol, measured with a refractive index detector from a column in equilibrium with pure dichloromethane. Experiments have been set up to demonstrate the displacement effect, predictable from the adsorption data, by a nonlinear pulse of methanol on a racemic mixture of temazepam injected at trace level. A most used method in fundamental studies of band behavior in chromatography has been used for modeling the system. An extraordinary increase of the apparent column efficiency has been observed due to the displacement phenomenon, with the peak of the second eluted enantiomer noticeably higher and narrower than that of the first eluted component.

Chiral chromatography on chiral stationary phases (CSPs) has become the most popular means for enantiomeric separations at both the analytical and the preparative scale. The reasons for this are the wide choice of chiral phases available, the recovery of both enantiomers being easier than with other techniques of chiral purification, and the largely favorable cost and yield factors of the process, in spite of the CSP costs. Chromatographic chiral separations are preferably performed in the normal-phase (NP) mode with mobile phases (MPs) constituted by mixtures of a base solvent (the so-called weak component) and one or several additives (or strong MP modifiers),¹ which serve to adjust the retention factor of the feed components.

Since additives are retained and thus equilibrate between the stationary and the mobile phase, sample injection causes a

perturbation of this equilibrium when the additive concentration is finite and its isotherm is not linear. As a consequence, linear chromatography cannot predict the chromatograms of even small samples. To understand and model the separation process, knowledge of the adsorption isotherm of the additive is, therefore, necessary.

Adsorption isotherms of low molecular weight compounds and peptides/proteins are routinely measured by HPLC.^{1–3} In frontal analysis (FA), the column is flushed with a solution of the compound of interest at constant concentration; after a suitable time, the concentration is abruptly changed; a new isotherm data point is derived from the characteristics of the breakthrough curve.^{1,4} FA is accurate but suffers from requiring a long time and much chemicals. The perturbation method (PM)^{5,6} (also minor disturbance method,⁷ linear perturbation¹ or perturbation on the plateau⁸ method) is based on the dependence of the retention time of a perturbation peak on the partial derivative of the isotherm at the plateau concentration.⁹ Peak perturbations are made by injecting small excesses or deficiencies of the studied components.^{10–13} This method was extensively employed by Kazakevich et al.^{7,12–15} and by Fornstedt et al.^{5,6,9–11} in their studies on retention mechanisms in liquid chromatography and in the determination

- (2) Seidel-Morgenstern, A. *J. Chromatogr., A* **2004**, *1037*, 255–272.
- (3) Michel, M.; Epping, A.; Jupke, A. In *Preparative Chromatography of Fine Chemicals and Pharmaceutical Agents*; Schmidt-Traub, H., Ed.; Wiley-VCH: Weinheim, 2005; pp 215–307.
- (4) Jacobson, J.; Frenz, J.; Horváth, C. *J. Chromatogr.* **1984**, *316*, 53–68.
- (5) Lindholm, J.; Forssén, P.; Fornstedt, T. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 4856–4865.
- (6) Lindholm, J.; Forssén, P.; Fornstedt, T. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 5472–5478.
- (7) Rustamov, I.; Farcas, T.; Ahmed, F.; Chan, F.; LoBrutto, R.; McNair, H. M.; Kazakevich, Y. V. *J. Chromatogr., A* **2001**, *913*, 49–63.
- (8) Blümel, C.; Hugo, P.; Seidel-Morgenstern, A. *J. Chromatogr., A* **1999**, *865*, 51–71.
- (9) Forssén, P.; Lindholm, J.; Fornstedt, T. *J. Chromatogr., A* **2003**, *991*, 31–45.
- (10) Samuelsson, J.; Forssén, P.; Stefansson, M.; Fornstedt, T. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 953–958.
- (11) Samuelsson, J.; Arnell, R.; Fornstedt, T. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 2765–2771.
- (12) Kazakevich, Y. V.; LoBrutto, R.; Chan, F.; Patel, T. *J. Chromatogr., A* **2001**, *913*, 75–87.
- (13) Kazakevich, Y. V.; McNair, H. M. *J. Chromatogr. Sci.* **1995**, *33*, 321–327.
- (14) Kazakevich, Y. V. *J. Chromatogr., A* **2006**, *1126*, 232–243.
- (15) Kazakevich, Y. V.; McNair, H. M. *J. Chromatogr., A* **2000**, *872*, 49–59.

* To whom correspondence should be addressed. E-mail: cvz@unife.it. Fax: +39.0532.240709.

[†] University of Ferrara.

[‡] Università degli Studi di Roma.

(1) Guiochon, G.; Felinger, A.; Shirazi, D. G.; Katti, A. *Fundamentals of Preparative and Nonlinear Chromatography*, 2nd ed.; Elsevier Academic Press: Amsterdam, 2006.

Table 1. Langmuir Adsorption Isotherm Parameters for Temazepam Enantiomers and MeOH

	first-tem		second-tem		MeOH NLP
	FA	IM	FA	IM	
<i>a</i> (L/g)	2.22 ± 0.18	1.95	3.62 ± 0.26	3.67	6.78
<i>b</i>	0.071 ± 0.009	0.057	0.12 ± 0.01	0.11	1.60

of the column void volume.¹⁶ Recently, Fornstedt et al.^{5,6,9} extended PM to quaternary systems and reviewed in detail the advantages and drawbacks of this technique. The inverse method (IM) is an attractive alternative to both these approaches^{17–19} because it much reduces the amounts of material and time required to measure adsorption isotherms. It requires only a few injections of samples at various concentrations. The isotherm parameters are obtained by iteratively solving the chromatographic mass balance equation (that describes the mass accumulation in a infinitesimal slice of the column), adjusting the adsorption parameters until optimal matching between calculated and experimental profiles.^{18,20}

The determination of adsorption isotherm data for strongly adsorbed species presents important difficulties, especially if the UV absorption of these compounds is weak or negligible (e.g., alcohols, esters, etc.), which includes the most common MP modifiers used in NPLC. These components adsorb strongly on polar surfaces, via hydrogen bonding, and are nearly impossible to detect in UV, which makes the use of refractive index (RI) detection needed. Then, FA requires the use of extremely diluted solutions of additives in the weak solvent, reducing the sensitivity of the RI detectors and increasing the risk of injecting samples that are too concentrated. Also, as shown by Felinger,²¹ the proper investigation of the initial region of the adsorption isotherm requires the acquisition of a large number of data points in the linear range of the isotherm, particularly if the density of high-energetic sites is low. The PM is preferred for the investigation and the interpretation of the adsorption of organic modifiers on reversed-phase adsorbent.^{7,12,14} In NPLC conditions, however, this method presents a drawback due to the difficulty of detecting linear perturbation peaks of strong modifiers in columns equilibrated with a weak solvent.²²

We studied the adsorption of methanol (MeOH) from its binary solution in dichloromethane on a hybrid polymeric CSP recently synthesized.^{23,24} This was achieved through a modification of the traditional IM. The difference between this new approach and typical IM^{18,19} is in the injected volumes. To avoid the saturation of the strong adsorption sites on the stationary phase, in fact, small

volumes of MeOH (a few microliters) were injected in a column in equilibrium with CH₂Cl₂. Estimation of isotherm parameters was obtained by the analysis of nonlinear perturbations (NLPs) of methanol recorded under these conditions. Additionally, the information regarding the retention of MeOH at infinite dilution obtained through NLPs was compared with the best estimation of this quantity via PM. Limitations of PM for the study of adsorption from diluted solutions of species that are strongly retained in NPLC have been discussed.

EXPERIMENTAL SECTION

Chemicals. Temazepam was a gift from F.I.S. (Montecchio Maggiore, Italy). MeOH and CH₂Cl₂ (amylene stabilized) were HPLC grade, purchased from Baker (Deventer, The Netherlands) and from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Solvents were filtrated before use with a Millipore apparatus (Billerica, MA) and Supelco Nylon-66 membrane filters with a 0.22- μ m pore size (Bellefonte, PA).

Chromatographic Apparatus. A modular Jasco chromatograph (Easton, MD) consisting of a PU-1580 Intelligent HPLC pump, a LG-1580-02 ternary gradient unit (three-pump, high-pressure system), a DG-980-50 3-line degasser, and a RI-1530 Intelligent refractive index detector was used. The system was interfaced to an Agilent 1100 Series diode array detector (Palo Alto, CA) placed downstream the RI detector. Injections were made by using a Rheodyne 7725i injector (Cotati, CA); 0.5-, 20-, and 160- μ L loops were used. Mobile-phase flow rates were 0.4 and 1.0 mL/min, depending on the performed measurements (see later on). The temperature was 23 ± 2 °C. Extracolumn volumes (determined through marker injections after removing the column) were systematically subtracted from experimental data before data elaboration. They were 0.015 (RI) and 0.030 mL (DAD). The column was a 50 mm × 4.6 mm stainless steel column packed with polymeric DACH-ACR CSP (particle diameter, 5 μ m; pore diameter, 300 Å).²³

Chromatographic Procedures and Measurements. Chromatographic measurements were performed under analytical (linear) and nonlinear conditions with different experimental setups. All measurements were repeated at least twice.

Analytical Conditions. Under linear conditions, two kinds of measurements were done. In the first series, temazepam racemate was dissolved in the same MP composition at which the column was equilibrated during measurements (standard chromatographic conditions). Different MeOH/CH₂Cl₂ MP compositions were used. MeOH amount was 0, 1, 3, and 5 v/v % in the different cases. The injection loop was 20 μ L, and the flow rate 0.4 mL/min. In the second set of measurements, the column was in equilibrium with pure CH₂Cl₂. Temazepam samples were dissolved in CH₂Cl₂/MeOH mixtures varying in composition from 0 to 90 v/v %. Injections were made in a 0.5- μ L loop at a flow rate of 0.4 mL/min. Under analytical conditions, UV detection was at 210 nm.

Nonlinear Conditions. *Temazepam Adsorption Isotherms.* Temazepam competitive adsorption isotherms were measured with two different approaches, FA and IM, from dilute solutions of the racemate in CH₂Cl₂. Under nonlinear conditions, UV signal was 342 nm. Competitive FA injections were performed through a 2.5-mL loop installed on the manual injection valve. This volume was large enough to observe concentration plateaus at detector. A total of 24 temazepam solutions were prepared: 10 in the range

(16) Kazakevich, Y. V.; McNair, H. M. *J. Chromatogr. Sci.* **1993**, *31*, 317–322.

(17) Dose, E. V.; Jacobson, S.; Guiochon, G. *Anal. Chem.* **1991**, *63*, 833–837.

(18) Felinger, A.; Cavazzini, A.; Guiochon, G. *J. Chromatogr., A* **2003**, *986*, 207–225.

(19) Arnell, R.; Forssén, P.; Fornstedt, T. *J. Chromatogr., A* **2005**, *1099*, 167–174.

(20) Forssén, P.; Arnell, P.; Fornstedt, T. *Comput. Chem. Eng.* **2006**, *30*, 1381–1391.

(21) Felinger, A. *J. Chromatogr., A* **2006**, *1126*, 120–128.

(22) Cavazzini, A.; Nadalini, G.; Costa, V.; Dondi, F. *J. Chromatogr., A* **2007**, *1143*, 134–142.

(23) Gasparrini, F.; Misiti, D.; Rompietti, R.; Villani, C. *J. Chromatogr., A* **2005**, *1064*, 25–38.

(24) Cavazzini, A.; Dondi, F.; Marmai, S.; Minghini, E.; Massi, A.; Villani, C.; Rompietti, R.; Gasparrini, F. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 3113–3122.

0–1 g/L (+0.1 g/L each step) and 14 between 1 and 8 g/L (+0.5 g/L each step). Flow rate was 1.0 mL/min. First and second eluted enantiomer adsorbed amounts, q_1 and q_2 , were calculated through⁴

$$q_1 = \frac{(V_2 - V_0)C_1 - (V_2 - V_1)C_{1,m}}{V_s} \quad (1)$$

and

$$q_2 = (V_2 - V_0)C_2/V_s \quad (2)$$

where V_1 and V_2 represent the retention volumes of the first and second shocks of the competitive FA profile, $C_{1,m}$ is the concentration of the first component at the intermediate plateau, V_0 is the holdup volume, and V_s is the stationary-phase volume.

In Table 1 (columns 1 and 3), the isotherm parameters obtained by nonlinear fitting of FA data via a two-component ($n = 2$) competitive Langmuir isotherm

$$q_i = \frac{a_i C_i}{1 + \sum_{j=1}^n b_j C_j} \quad i, j = 1, \dots, n \quad (3)$$

are reported. In eq 3, subscripts i, j refer to the i, j th species of a multicomponent system, and a_i and b_i are the adsorption Henry constant and the adsorption equilibrium constant for the i th species, respectively.

Based on the IM, the best estimates of isotherm parameters are calculated by minimizing the differences between one or several experimental overloaded peaks and the corresponding simulated profiles obtained by solving a given model of nonlinear chromatography for an a priori assumed adsorption isotherm model (a comprehensive description of IM can be found in ref 18). In this work, the equilibrium dispersive model (eq 10) has been employed for calculation. For IM calculations, overloaded injections of the following temazepam racemate solutions were performed: 0.5, 1.0, 2.4, 5.2, and 8.2 g/L. The loop was 160 μ L. Flow rate was 1.0 mL/min. Table 1 (columns 2 and 4) lists the best isotherm parameters obtained through IM calculations.

MeOH Adsorption Isotherm. MeOH adsorption isotherm was determined by using a method based on NLPs (see Discussion for details). MeOH/CH₂Cl₂ solutions were injected by using a 0.5- μ L loop. MeOH solution concentrations were as follows: 0.768, 3.93, 15.72, 23.58, 31.44, 39.93, and 47.16 g/L (approximately, 0.1, 0.5, 2, 3, 4, 5, and 6% v/v). Traditional measurements for isotherm determination based on linear perturbations were also executed. In this case, the column was equilibrated at 15 different MeOH/CH₂Cl₂ compositions and perturbations were performed through injections of MP, CH₂Cl₂, and MeOH. The retention times of perturbation peaks, obtained in the different ways, were found to be coincident. MPs were prepared by using two channels of the ternary pump. One pump of the solvent delivery system pumped pure MeOH whereas the other pumped pure CH₂Cl₂ (MeOH amount was increased by +10% in each stage). To have more information on adsorption from dilute solutions, perturbation data at 0.5, 1, 2, and 5 v/v % MeOH were collected. In these cases,

solutions were prepared by hand. Perturbation signal detection was performed by RI detector. Flow rate was 0.4 mL/min. Injection loop, 0.5 μ L.

Chromatographic Parameters. Column holdup volume was evaluated through the so-called thermodynamic definition:¹⁶

$$V_0 = \frac{\int_0^{C_{\max}} V_R(C) dC}{C_{\max}} \quad (4)$$

where the retention volumes of linear disturbances, $V_{R,s}$, are determined over the whole concentration range [0– C_{\max}] (from pure weak component to 100% of strong MP modifier). V_0 was found to be 0.56 ± 0.02 mL. The stationary phase volume can be simply calculated as

$$V_s = V_{\text{col}} - V_0 \quad (5)$$

where V_{col} is the geometrical volume of the column. V_s was found to be 0.27 ± 0.01 mL.

Finally, retention volume at infinite dilution for the i th component is¹

$$V_{R,i} = V_0(1 + F a_i) \quad (6)$$

where $F(= V_s/V_0)$ is the phase ratio.

$V_{R,i}$ and V_0 obtained through eqs 4 and 6 were used to calculate the capacity factor, k' , of the different species.

COMPUTATION

All the calculation were performed on a Intel(R) Xeon(TM) CPU 3.06-GHz Linux machine by using the GNU Fortran 77 compiler.

Competitive FA Calculations. Gnuplot 4.0.0²⁵ was used to perform nonlinear fitting of temazepam FA competitive isotherm data. The competitive Langmuir isotherm (eq 3, $n = 2$) was used as fitting function.

IM Calculations. An optimized simplex routine was employed for the research of best isotherm parameters with the IM.^{18,26}

MeOH Excess Isotherm. The excess isotherm of MeOH (amount of MeOH per unit of adsorbent surface¹⁴) from a binary mixture of MeOH and dichloromethane was calculated by^{12,13}

$$\Gamma(C^*) = \int_0^{C^*} \frac{V_R - V_0}{A_s} dC \quad (7)$$

where $V_{R,s}$ are the retention volumes of perturbations (measured over the whole concentration range [0– C_{\max}]) and A_s is the adsorbent surface area (100.7 m²/g for the packing material employed in this work). Integration of the retention volumes was carried out after point interpolation via cubic-spline. Cubic-spline routines were taken from ref 27.

(25) <http://www.gnuplot.info/faq/>.

(26) Morgan, E.; Burton, K. W. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **1990**, *8*, 97–107.

(27) Press, W. H.; Teukolsky, S. A.; Vetterling, W. T.; Flannery, B. P. *Numerical Recipes in Fortran, The Art of Scientific Computing*, 2nd ed.; Cambridge University Press: New York, 1994.

IR Detector Calibration. RI detector calibration was performed through a nonlinear optimization approach based on mass balance considerations (namely, the fact that the injected amount has to be equal to the eluted amount), that is

$$V_{\text{inj}}C_{\text{inj}} = \int Y(\mathbf{P}, C, V_{\text{R}}) dV_{\text{R}} \quad (8)$$

where V_{inj} and C_{inj} represent the injection volume and concentration, respectively; C is the MP concentration; $Y(\mathbf{P}, C, V_{\text{R}})$ is the signal in RI units and \mathbf{P} the vector of the parameters to be optimized. The following functional relationship between detector response and concentration was employed:^{28,29}

$$Y(\mathbf{P}, C) = p_1[1 - \exp(-p_2C)] \quad (9)$$

where $\mathbf{P} = \{p_1, p_2\}$. Least-square fitting was performed through Levenberg–Marquardt’s method by using the subroutines described in ref 27.

Mass Balance Equation Solution. The mass balance equation, eq 10, was solved by using a forward–backward difference scheme (Rouchon’s algorithm). Typical boundary and initial conditions were employed.¹

THEORY

In displacement chromatography, a rectangular band of sample is introduced into the column, which has first been filled with low- or moderate-strength eluent. Since the MP is weaker than the one that would be used to elute the sample in elution mode, retention volumes of components eluted under these conditions are large. Upon completion of sample injection, the MP is replaced by a stream of displacer solution. Displacers are species that are more strongly adsorbed than any component of the mixture. Their concentration must be large enough to allow their breakthrough curves to interfere with the sample bands. If the experimental conditions are properly chosen, a steady state is reached and a succession of quasi-rectangular bands of pure sample is eluted.¹ The one requirement for performing displacement chromatography is that the adsorption isotherms of the feed components and the displacer are convex upward and do not intersect each other. Thus, an operating line can be chosen and the separation modeled on the base of nonlinear chromatography theory.¹ In order to model nonlinear separation of mixtures, an adsorption model from dilute solutions is required. The competitive Langmuir isotherm is usually taken as a first approximation (eq 3). In the case of displacement chromatography, the summation in eq 3 extends to all components of the mixture and to the displacer. For a trace component k , however, the corresponding term, $b_k C_k$, can be neglected as long as C_k remains small.

In this work, one of the methods most often used in fundamental studies of the behavior of bands in chromatography^{1,8,9,18,19} was employed. In particular, the differential mass balance equation for the equilibrium dispersive model of chromatography (eq 10) was written in terms of stationary, q , and mobile phase, C , concentrations

$$\frac{\partial C_i}{\partial t} + F \frac{\partial q_i}{\partial t} + u \frac{\partial C_i}{\partial z} = D_{L,i} \frac{\partial^2 C_i}{\partial z^2} \quad i = 1, \dots, n \quad (10)$$

where t and z are the time elapsed from the injection and the distance traveled by the band along the column; u is the MP linear velocity. $D_{L,i}$ is an apparent dispersion coefficient (for the i th component) that accounts for all mass-transfer effects.¹

Writing the mass balance equation in terms of q and C corresponds to implicitly introducing into the model the mathematical boundary in the interfacial system-Gibbs dividing plane.^{1,14,30} Kazakevich and McNair¹³ and, more recently, Kazakevich¹⁴ have shown that, “while using excess adsorption concept, the introduction of Gibbs dividing plane is unnecessary for construction and solution of the mass balance equation”. That is to say, the physical meaning of adsorption parameters obtained in the framework of different theoretical models has to be strictly referred to the assumptions of that specific model.

RESULTS AND DISCUSSION

The chiral polymeric phase in use in this work is characterized by the presence of numerous amide groups.²³ They give to the surface both a weak hydrogen-bonding donor and a strong hydrogen-bonding acceptor propensity through amide NH and carbonyl groups, respectively. Previous investigations have shown that, under NP conditions, analyte retention and enantioselectivity is strongly connected to hydrogen-bonding donor character.²⁴

Enantiomers able to give this kind of interaction are strongly retained and give excellent separations on the hybrid polymeric CSP. In contrast, species without hydrogen-bonding donor propensities can be eluted also in weak solvents (100% CH_2Cl_2), but usually they are poorly separated.^{23,24} Their separation, moreover, is significantly affected by the amount of strong modifiers, usually alcohols, present in the system. Alcohols may interact with the CSP through their OH moieties.

Figure 1 shows the effect of MP MeOH content on the separation of temazepam racemate (for the chemical structure of this molecule see, for instance, ref 24). Temazepam was chosen in this work as probe compound since it is unable to give hydrogen-bonding donor interactions and can be eluted also in the weak solvent.²⁴ Increasing the MeOH concentration causes progressive decrease of retention and chromatographic selectivity, which for MeOH 5 v/v % has been completely lost (Figure 1, top).

Common operative conditions in NP mode recommend the use of 5–10 v/v % strong additive in the weak solvent as MPs.^{1,31} This is also so for the polymeric CSP employed in this work.²³ Such conditions are, in general, adopted as starting point for analysis without further considerations. This point, however, deserves a more detailed study that has to start from the investigation of MeOH adsorption equilibria on the hybrid polymeric CSP (or, generically, of the employed additive on the actual CSP).

As has been previously observed,²² the use of the traditional technique for isotherm determination, based on linear perturbations, can be critical to investigate adsorption of species that strongly interact with the stationary phase, such as alcohols in NP mode. The reason for this is connected to the experimental

(28) Ghazy, R.; El-Baradie, B.; El-Shaer, A.; El-Mekawey, F. *Opt. Laser Technol.* **1999**, *31*, 335–340.

(29) Fukuta, M.; Yanagisawa, T.; Miyamura, S.; Ogi, Y. *Int. J. Refrig.* **2004**, *27*, 346–352.

(30) Riedo, F.; Kováts, E. *SZ. J. Chromatogr.* **1982**, *239*, 1–28.

(31) Chiral Technologies Europe, www.chiral.fr.

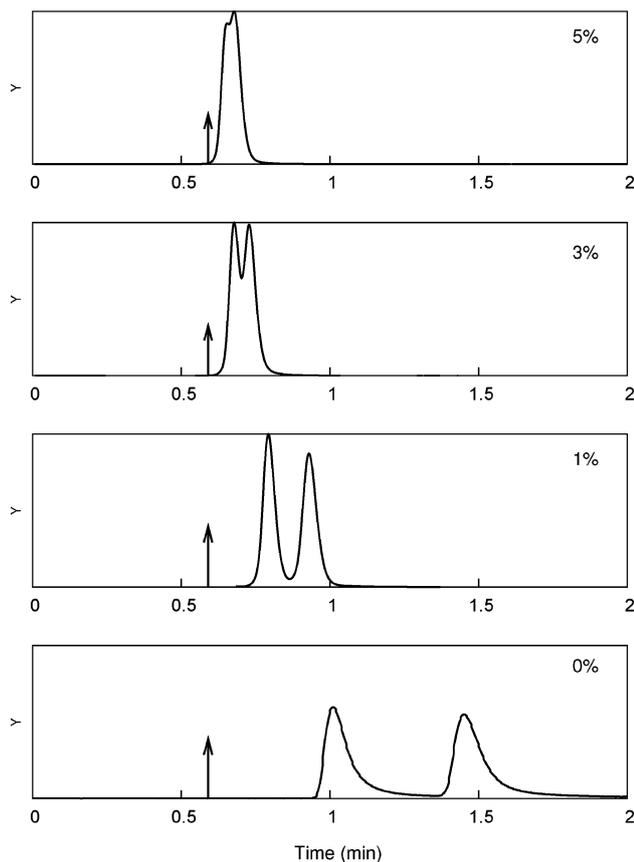


Figure 1. Effect of the MP composition on the separation of racemic temazepam. Top-right labels: MeOH v/v % in mobile phase. Vertical arrows: holdup volume.

difficulty of performing and detecting modifier linear perturbations in columns equilibrated with the weak solvent, due to the strong interactions between modifier molecules and active sites on the bare surface. The extremely large retention volumes under these conditions cause poor signal-to-noise ratios that make detection difficult. The consequence is that the initial part of the adsorption isotherm, that is, adsorption from very diluted solutions, cannot be investigated. This happens for different reasons when UV and RI detectors are employed.²² With the former, the problem is the elevated instrumental noise characteristic of wavelengths near to solvent cutoff, at which the detector has to be operated to perform these measurements. With the latter, detection of perturbations can be difficult because of instrumental limited sensitivity (if compared to UV) and there is the risk of injecting samples that are too concentrated.

These concepts are evidenced in Figure 2, where linear perturbation retention volumes are plotted versus the binary mixture composition. Two series of data (circles and squares) are represented in this plot based on RI detection. The circles show the perturbation signals detected by equilibrating the column at binary compositions varying from 0.05 to 100% MeOH/CH₂Cl₂. Perturbations were created by minimal injections of CH₂Cl₂, MeOH, or MP (see Experimental Section). In this case, it was not possible to detect any signal at zero MeOH concentration due to the limit of detection of the RI instrument under the experimental conditions studied. The first point in this plot, thus, refers to a solution MeOH/CH₂Cl₂ 0.5:99.5 v/v % (Figure 2, point labeled "0.05%").

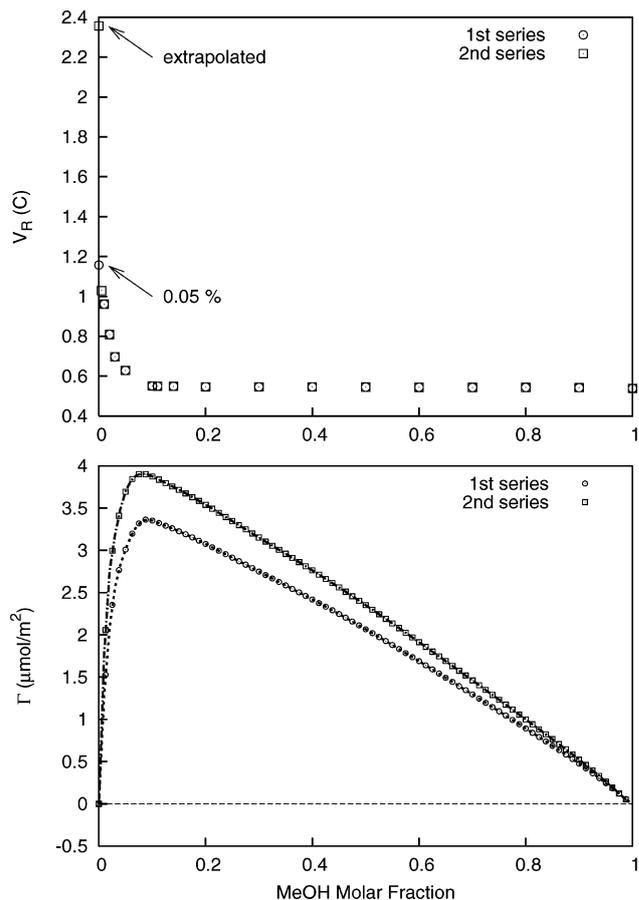


Figure 2. Top: Linear perturbation volumes of MeOH as a function of the binary mixture composition (MeOH/CH₂Cl₂). Bottom: MeOH excess adsorption isotherm ($\mu\text{mol}/\text{m}^2$ adsorbent) calculated by excluding (first series) or including (second series) the extrapolated point (see text for details).

This can be considered as the best experimental estimation of MeOH retention at infinite dilution through PM. The squares include the point at zero MeOH concentration (obtained by the analysis of NLPs as will be described later). It is worth observing that the retention volume of this perturbation peak is almost twice as large as that measured at 0.05 v/v %. This means that, to characterize alcohol adsorption on the CSP, the initial region of the adsorption isotherm is extremely important. The effect of considering or removing this point from the calculation of the excess isotherm (eq 7) has been shown in the lower part of Figure 2. As is evident, the maximums of the two curves are different as are the slopes of the plot regions where Γ is a linear decreasing function of the additive amount. Incidentally, it can be observed that information about adsorbed surface concentration is typically derived by linear interpolation of this region, once a model for the adsorbed layer structure has been assumed.¹⁴ These calculations, thus, show that using PM data for the interpretation of adsorption phenomena from dilute solutions of species that strongly interact with the surface can be critical unless a very accurate study of the initial region of the adsorption isotherm is performed.

Figure 3 shows a series of NLPs measured by injecting different MeOH amounts, from roughly 0.12 μmol (chromatogram represented in the figure with a continuous line, corresponding

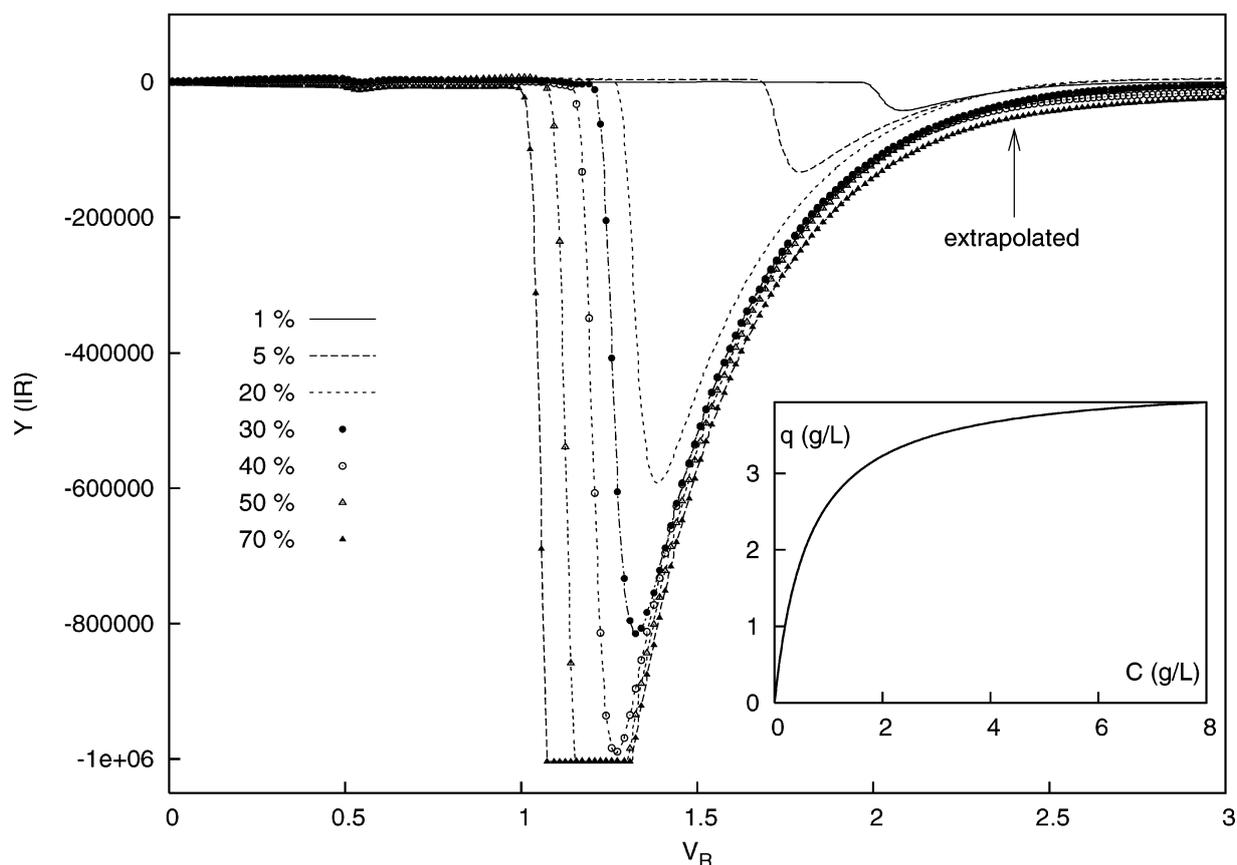


Figure 3. NPLs at increasing MeOH concentrations. Injection loop, 5 μL . Key: injected MeOH solutions (v/v %). Inset: adsorption isotherm of MeOH calculated by applying the IM on the signals that did not cause detector saturation.

to a 5- μL injection of MeOH/CH₂Cl₂ 1:99 v/v %) to $\sim 8.6 \mu\text{mol}$ (black triangles, MeOH/CH₂Cl₂ 70:30 v/v %). Peaks corresponding to alcohol solutions more concentrated than 50 v/v % are characterized by truncated apexes due to RI detector saturation. Interpretation of recorded peaks in light of the theory of nonlinear chromatography suggests that a Langmuirian-type adsorption behavior is expected for MeOH on the hybrid polymeric CSP. NPLs are, in fact, characterized by shocks in their fronts, which move to lower retention volumes by decreasing the injected amounts, and elongated diffuse tails. At the limit of infinite dilution, one expects the retention time to move toward the very end of peak tails. As was previously discussed, however, this limit could not be experimentally evidenced because of RI detector sensitivity limit. The peak corresponding to the smallest detectable amount (MeOH 1 v/v %, see Figure 3) is still characterized by a relevant asymmetry degree.

NPLs that did not cause detector saturation were used to determine, through IM, the MeOH adsorption isotherm. The best fit isotherm parameters obtained by this approach are $a = 6.78 \text{ L/g}$ and $b = 1.60$ (Table 1, column 5); the inset of Figure 3 shows the adsorption isotherm for MeOH calculated from the IM numerical procedure. The retention volume at infinite dilution can be now calculated by means of eq 6: V_R equal to 2.4 mL is obtained for MeOH on the bare CSP. This is the "extrapolated" point in Figures 2 and 3. The column saturation capacity, q_s , for MeOH is calculated to be 4.25 g/L, which means that the amount of alcohol necessary to saturate the adsorptive material is approximately

$n_{\text{MeOH,s}} = 35 \mu\text{mol}$, eq 11, where M_w is the molecular weight of MeOH

$$n_{\text{MeOH,s}} = q_s V_s / M_w \quad (11)$$

It is interesting to compare this value with those typical of NP applications. Chromatograms represented in Figure 1 have been recorded after equilibration of the column at different MP compositions (figure's keys indicate the percentage of MeOH in each case). For instance, when the column is in equilibrium with a 3 v/v % MeOH solution, roughly 0.4 mmol of the alcohol, $n_{\text{MeOH,3\%}}$, can be estimated to be present in the system:

$$n_{\text{MeOH,3\%}} = 0.03(\delta V_0 / M_w) \quad (12)$$

where δ is MeOH density. Thus, in a typical MP composition for NP chromatography, alcohol amount is at least 10 times larger than the amount required to saturate the stationary phase. Accordingly, the mechanism of how modifiers affect analyte retention in NP chromatography would seem to be twofold: by monolayer coverage formation; and, after monolayer completion, through a statistical effect inasmuch as the larger the number of molecules inside the system the higher the probability of impinging on the adsorptive surface and the stronger the competition for the adsorption.

Based on authors' experience,^{32–35} MP modifier amounts used in almost all practical NP mode separations are large enough to assume the completion of adsorption surface monolayers. These findings are consistent with theories or semiempirical models, employed to describe retention in NP chromatography, in which surface monolayer coverage is implicitly assumed. For instance, based on it, the so-called Snyder's equation linearly correlates $\log k'$ to the logarithm of strong-additive MP concentration.³⁶ This equation is very often employed to describe retention in NP mode.

To validate the measured data and to assess the procedure for MeOH adsorption isotherm determination, a set of experiments were carried out in which trace amounts of temazepam racemate, dissolved in a MP made of the weak solvent and nonlinear amounts of the additive, were injected in a column in equilibrium with the weak component. This sort of elution-modified displacement chromatography applied to trace analysis,^{37–39} in which the displacer is the MP modifier, was conceived to exploit the "bulldozer effect"⁴⁰ carried out by MeOH over temazepam molecules, predictable by comparing MeOH and temazepam isotherm parameters (see Table 1). The one constraint here is the Henry constant of MP modifier to be larger than those of mixture components. Accordingly, measuring the adsorption isotherm of analytes is not necessary since injections in linear conditions (trace amounts) are performed and a mere knowledge of their Henry adsorption constants is enough. In this sense, the measure of adsorption isotherms for the analytes is redundant.

Interference between MeOH shock layers (whose retention volume is a function of the injected amount) and temazepam enantiomers causes the displacement of the latter from the stationary phase and the squeezing of their bands.⁴¹ This is demonstrated in Figures 4 and 5 where the band profiles of MeOH, L-temazepam and D-temazepam are measured and calculated with temazepam racemate injected in MeOH/CH₂Cl₂ solutions at increasing concentrations of MeOH (1, 10, 20, 40 v/v %). The calculations were performed by solving eqs 3 and 10 ($n = 3$). The column, in these experiments, was always equilibrated with CH₂Cl₂.

In these figures, UV and RI signals are overlapped (the symbol Y, on the y-axis, merely represents a detector response). Experimentally, the chromatograms were obtained by placing the two detectors in series (in the figures, the different extracolumn volumes have been taken into account). UV signal, used for temazepam detection, is represented with dotted lines. The RI detector was used to detect MeOH nonlinear pulses; its trace is

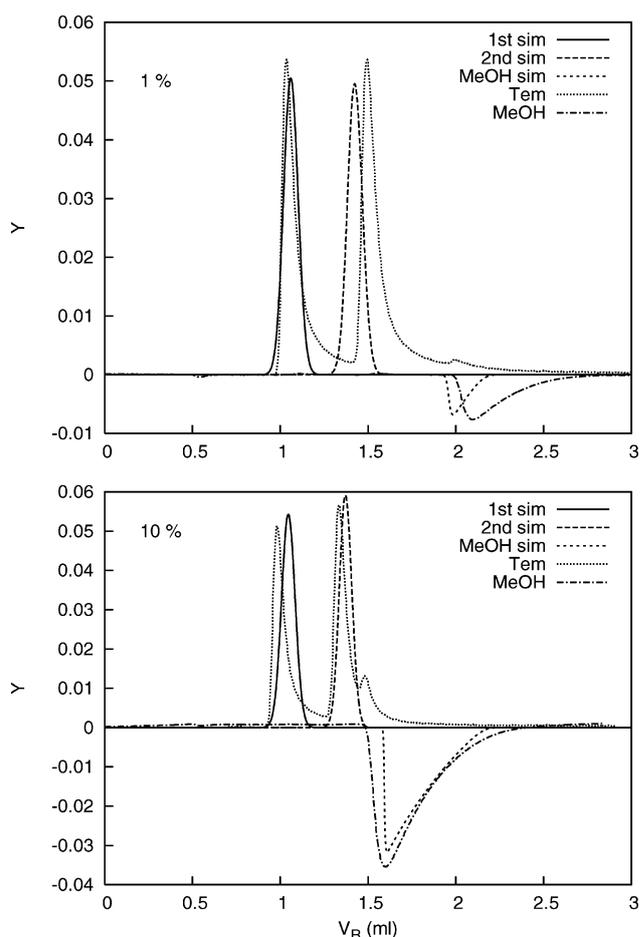


Figure 4. Displacement effect by a nonlinear pulse of MeOH on racemic temazepam injected at trace level. Injection loop, 0.5 μ L. Top-left labels: MeOH v/v % in the injected solutions of racemic temazepam in CH₂Cl₂. Column in equilibrium with CH₂Cl₂. Caption: (...) UV detection of enantiomers. (-.-.-) RI signal for MeOH. (---) Calculated band profiles of the enantiomers. (---) Calculated band profile for MeOH.

drawn with dashed-dotted lines in these figures (negative intensity). Continuous and the long-dashed lines represent calculation results for the first and the second eluted enantiomers, respectively. Finally, simulated MeOH peaks are indicated with dashed lines.

For each of the experimental cases, a robust agreement with theory is noted. This is demonstrated by the significant agreement between simulations and measured peaks for both enantiomer profiles and MeOH nonlinear pulses, apart from a general smaller efficiency of the real system with respect to calculations possibly due to kinetic effects that were not accounted for in the model used for calculation (eq 10). These experiments can be taken as a validation, in the framework and within the limits of the model proposed, of the adsorption data for MeOH. The system used for this purpose is nonlinear for MeOH but linear for the two enantiomers, which were injected at trace concentrations. This explains why the simple adsorption model used (eq 3, $n = 3$) allows for a reasonably accurate modeling of the experimental data and the displacement effect. Obviously, if large amounts of the racemate mixture had been injected, this simple model would not have been expected to work.

(32) Cavazzini, A.; Kaczmarek, K.; Szabelski, P.; Zhou, D. M.; Liu, X. D.; Guiochon, G. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 5704–5715.

(33) Nadalini, G.; Dondi, F.; Massi, A.; Dondoni, A.; Zhang, T.; Cavazzini, A. *J. Chromatogr., A* **2006**, *1126*, 357–364.

(34) Cavazzini, A.; Felinger, A.; Kaczmarek, K.; Szabelski, P.; Guiochon, G. *J. Chromatogr., A* **2002**, *953*, 55–66.

(35) Zhou, D.; Kaczmarek, K.; Cavazzini, A.; Liu, X.; Guiochon, G. *J. Chromatogr., A* **2003**, *1020*, 199–217.

(36) Snyder, L. R. *Chromatography, Journal of Chromatography Library*, 5th ed.; Elsevier: Amsterdam, 1992; Vol. 51.

(37) Wilkins, J. A.; Xiang, R.; Horváth, C. *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 3933–3941.

(38) Katti, A. M.; Ramsey, R.; Guiochon, G. *J. Chromatogr.* **1989**, *477*, 119–130.

(39) Jacobson, S.; Golshan-Shirazi, S.; Katti, A. M.; Czok, M.; Ma, Z.; Guiochon, G. *J. Chromatogr.* **1989**, *484*, 103.

(40) Helfferich, F.; Klein, G. *Multicomponent Chromatography*; Marcel Dekker Inc.: New York, 1970.

(41) Ramsey, R.; Katti, A. M.; Guiochon, G. *Anal. Chem.* **1990**, *62*, 2557–2565.

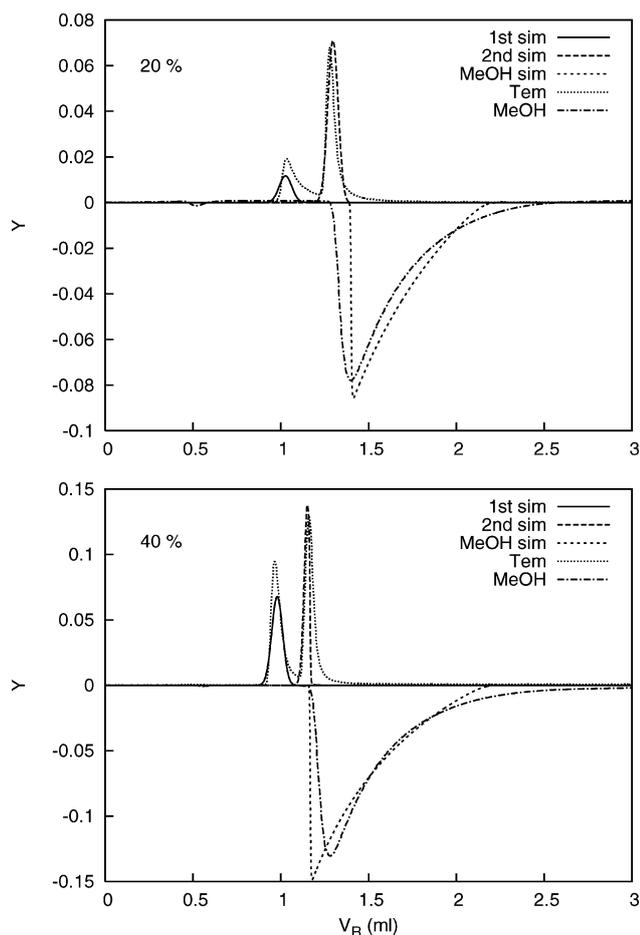


Figure 5. Displacement effect by a nonlinear pulse of MeOH on racemic temazepam injected at trace level. Injection loop, $0.5 \mu\text{L}$. Top-left labels: MeOH v/v % in the injected solutions of racemic temazepam in CH_2Cl_2 . Column in equilibrium with CH_2Cl_2 . Caption: (...) UV detection of enantiomers. (-.-.-) RI signal for MeOH. (---) Calculated band profiles of the enantiomers. (---) Calculated band profile for MeOH.

It is interesting to observe that, by only looking at UV traces, an additional analyte would seem to be present in the system, in addition to temazepam enantiomers (this is particularly evident in both cases represented in Figure 4, where a shoulder on the peak of the second enantiomer can be detected at 2 and 1.5 mL for top and bottom chromatograms, respectively). Indeed, this minor peak merely represents a UV signal disturbance due to the incoming MeOH front. This can be clearly demonstrated by comparing its position with respect to the nonlinear bands of the alcohol (negative pulses on top and bottom chromatograms of Figure 4).

A conclusive note is about temazepam adsorption data. Even though only the Henry constants were necessary to run the calculations, FA and IM techniques have been employed to measure the adsorption isotherms of temazepam (Table 1, columns 1–4). In the framework of the two theories, the obtained results are consistent.¹⁸

From a practical point of view, the performed experiments and the calculation results show that a noticeable increment of the column apparent efficiency can be achieved due to the displacement effect⁴¹ with the peak of the second eluted enantiomer

significantly higher and narrower than that of the first one (Figure 5).

CONCLUSIONS

The adsorption of methanol from its binary solution in dichloromethane on a hybrid polymeric CSP was investigated through an approach based on the analysis of NLPs of the alcohol measured under specific experimental conditions. We focused on the possibility of modeling the displacement effect of a nonlinear pulse of MeOH on a racemic mixture of temazepam, injected at trace level, by employing a most used method in fundamental studies of band behavior in chromatography. Often, under NPLC conditions, it is impossible to characterize properly the chromatographic behavior of analytes in the weak solvent due to their excessive retention. In the case of temazepam, instead, the enantiomers were easily eluted in pure CH_2Cl_2 , making our system an ideal one to investigate the effect of a strong modifier on the separation.

Since modifier and analytes were injected together, after equilibration of the column with the pure weak solvent, this application is similar to the elution-modified displacement chromatography^{37,42,43} of trace components.^{41,44,45} A considerable increase of the apparent column efficiency was observed, the peak of the second eluted enantiomer being higher and narrower than that of the first component. In principle, this kind of effect might be exploited, for instance, for the determination of enantiomeric purity in cases in which the presence of the unwanted enantiomer should be avoided even at trace level (for instance for chiral drugs).

A comparative analysis between NLP and PM data for the binary system MeOH/ CH_2Cl_2 has evidenced some limitations in the use of PM to study the adsorption of strongly adsorbed species in NPLC, unless an extremely accurate investigation of the initial region of the adsorption isotherm is performed. This was demonstrated by comparing the excess isotherm of MeOH from MeOH/ CH_2Cl_2 mixtures calculated in two different modes: (1) by employing the experimentally accessible PM data and (2) by including the information, achievable from NPL analysis, on the expected retention volume of a linear perturbation of the alcohol in a column in equilibrium with the pure weak component.

ACKNOWLEDGMENT

This work was supported by the Italian University and Scientific Research Ministry (2005037725_002) and by the University of Ferrara (ex-60%). Authors acknowledge fruitful, informative discussions with Georges Guiochon (University of Tennessee and ORNL, Knoxville, TN), Alessandro Massi and Paolo Dambruoso (University of Ferrara, Ferrara, Italy). They also acknowledge Alessandro Medici (University of Ferrara, Ferrara, Italy) for RI detector loan and F.I.S. (Montecchio Maggiore, Italy) for temazepam, a precious gift.

Received for review November 27, 2006. Accepted March 20, 2007.

AC062240O

(42) Xiang, R.; Horváth, C.; Wilkins, J. A. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 1819–1827.

(43) Rege, K.; Ladiwala, A.; Cramer, S. M. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 6818–6827.

(44) Golshan-Shirazi, S.; Guiochon, G. *Anal. Chem.* **1990**, *62*, 217–220.

(45) Zhu, J.; Katti, A. M.; Guiochon, G. *Anal. Chem.* **1991**, *63*, 2183–2188.

Binding of Dipeptides and Amino Acids to Teicoplanin Chiral Stationary Phase: Apparent Homogeneity of Some Heterogeneous Systems

Alberto Cavazzini,^{*,†} Luisa Pasti,[†] Francesco Dondi,[†] Marco Finessi,^{†,||} Valentina Costa,[†] Francesco Gasparrini,[‡] Alessia Ciogli,[‡] and Filippo Bedani[§]

Department of Chemistry, University of Ferrara, via L. Borsari 46, I-44100 Ferrara, Italy, Dipartimento di Studi di Chimica e Tecnologia del Farmaco, Università degli Studi di Roma, "La Sapienza", P.le A. Moro 5, I-00185 Roma, Italy, Polymer-Analysis Group, Van't Hoff Institute for Molecular Sciences, University of Amsterdam, Nieuwe Achtergracht 166, 1018 WV Amsterdam, The Netherlands

The binding between Teicoplanin glycopeptide antibiotic and some dipeptides and amino acids has been studied by nonlinear liquid chromatography. A Teicoplanin-based chiral stationary phase, specifically designed to achieve maximum selectivity and loading by reducing non-specific interactions, has been prepared and packed into a microbore column. The adsorption isotherms of the enantiomers of Proline, Alanine, and Alanine–Alanine (Ala-Ala) have been measured through frontal analysis. The experimental binding data have been interpreted in the context of the ordinary homogeneous Michaelis–Menten model and by considering an heterogeneous model that accounts for a broad adsorption energy distribution (AED). AED has been achieved by the analysis of adsorption isotherms. Besides confirming the importance of the terminal D-Ala-D-Ala moiety in the molecular recognition between the dipeptide and the macrocyclic antibiotic Teicoplanin (it was found that Teicoplanin behaves as a molecular filter toward the enantiomers of Ala-Ala), this study shows that a heterogeneous adsorption model is needed for the correct interpretation of binding data.

The interaction between amino acids and small peptides with macrocyclic antibiotics is important in many biological processes. Examples include the action of glycopeptide antibiotics upon Gram-positive bacteria or the binding of proteins or other compounds (drugs, enzymes, hormones) to this class of antibiotics. Glycopeptide antibiotics have a basket-like structure formed by aglycone connected macrocyclic rings.¹ The basket is surrounded by sugar moieties that consist of carbohydrate or saccharide groups. Since the target of these antibiotics is the D-Ala-D-Ala group, it was early on thought^{2,3} to introduce these

molecules as a new class of selectors for the chromatographic separation of enantiomers and for bioaffinity studies.^{4–6}

Chiral stationary phases (CSPs) for high-performance liquid chromatography (HPLC) are obtained by covalently binding the macrocyclic rings to silica gel particles using a variety of chemistries, which ensure their stability while retaining their chiral properties.⁷ Teicoplanin is unique among glycopeptide selectors in that it possesses a hydrophobic tail that gives it surfactant-like properties⁸ and unique selectivity for a number of classes of molecules such as amino acids, small peptides but also carboxylic acids, phenols, sulfoxides neutral aromatic analytes, cyclic aromatic analytes, and aliphatic amines.^{3,9,10}

Different chromatographic studies have been developed to give insights into recognition mechanisms between substrates and macrocyclic antibiotics.^{4–6,11–14} Even though the information gathered by these investigations is important to understand the mechanisms leading to selective binding, a limitation of most of them is that the interpretation of binding mechanisms is based on linear data. The retention factor measured under linear conditions includes the contributions of all the interactions between analytes and stationary phase, without permitting the separation of the nonselective interactions from the selective ones. Data afforded by nonlinear chromatography, on the other hand, allow it.

- (3) Armstrong, D. W.; Liu, Y.; Ekborg-Ott, K. H. *Chirality* **1995**, *7*, 474–497.
- (4) Berthod, A. *Chirality* **2009**, *21*, 167–175.
- (5) Berthod, A.; Mitchell, C. R.; Armstrong, D. W. *J. Chromatogr., A* **2007**, *1166*, 61–69.
- (6) Mitchell, C. R.; Armstrong, D. W.; Berthod, A. *J. Chromatogr., A* **2007**, *1166*, 70–78.
- (7) D'Acquarica, I.; Gasparrini, F.; Misiti, D.; Villani, C.; Carotti, A.; Cellamare, S.; Muck, S. *J. Chromatogr., A* **1999**, *857*, 145–155.
- (8) Ward, T. J.; Dann, C.; Blaylock, A. *J. Chromatogr., A* **1995**, *715*, 337–344.
- (9) Rundlett, K. L.; Gasper, M. P.; Zhou, E. Y.; Armstrong, D. W. *Chirality* **1996**, *8*, 88–107.
- (10) Wan, H.; Blomberg, L. *Electrophoresis* **1997**, *18*, 943.
- (11) Berthod, A.; Chen, X. H.; Kullman, J. P.; Armstrong, D. W.; Gasparrini, F.; D'Acquarica, I.; Villani, C.; Carotti, A. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 1767–1780.
- (12) Cavazzini, A.; Massi, A.; Bergamaschi, G.; Braga, S.; Dondi, F.; Dondoni, F. *Biotechnol. Prog.* **2004**, *20*, 603–612.
- (13) Berthod, A.; Liu, Y. B.; Bagwill, C.; Armstrong, D. W. *J. Chromatogr., A* **1996**, *731*, 123–137.
- (14) Gasper, M. P.; Berthod, A.; Nair, U. B.; Armstrong, D. W. *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 2501–2514.

* To whom correspondence should be addressed. E-mail: cvz@unife.it.

[†] University of Ferrara.

[‡] Università degli Studi di Roma.

[§] University of Amsterdam.

^{||} Current address: Sciences II-CHIAM, Université de Genève, 30, Quai Ernest-Ansermet, CH-1211 Genève 4, Switzerland.

(1) D'Acquarica, I.; Gasparrini, F.; Misiti, D.; Pierini, M.; Villani, C. *Adv. Chromatogr.* **2008**, *46*, 109–173.

(2) Armstrong, D. W.; Tang, Y. B.; Chen, S. S.; Zhou, Y. W.; Bagwill, C.; Chen, J. R. *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 1473–1484.

Frontal analysis (FA) of substrates on columns packed with Teicoplanin-bonded silica particles allows directly data (adsorption isotherm) regarding the interactions between the macrocyclic antibiotic and substrates dissolved in the mobile phase. Methods based on the determination of the adsorption isotherm compete successfully with some traditional binding assays, for example, ELISA, Surface Plasmon Resonance in some important cases.^{15,16} FA permits the direct measurement of the equilibrium constant of a substrate molecule with Teicoplanin (or any other macrocyclic antibiotic) immobilized on a packing material and the determination of their interaction energy. FA measures also the relative strength of the interactions between Teicoplanin and different substrates. The most important advantage of FA over conventional binding assay techniques is that, in a very wide concentration range, the precision of the data measured, the retention time of a breakthrough curve, is independent of the substrate concentration.¹⁵ Furthermore, FA measurements provide information on both the thermodynamics and the kinetics of the interactions studied (through the retention time and the shape of the breakthrough curve, respectively). Finally, the binding event takes place in the column, so the detector can be selected independently, which provides a high degree of flexibility in the experimental design.¹⁵ The main disadvantage of FA, which has limited its acceptance in biochemical laboratories, is a reputation of requiring large amounts of materials. However, the advent of narrow-bore HPLC columns and the related technology has permitted the use of sample sizes comparable to those needed in conventional binding assays.¹⁷ The modeling of the isotherm data provides the equilibrium constant, the binding energy (from the adsorption energy distribution or the temperature dependence of the equilibrium constant), and the saturation capacity, itself related to the amount of antibiotic in the column.

The investigations performed in this work have concerned the adsorption behavior of the amino acids L,D-Ala and L,D-Pro and the dipeptides D-Ala-D-Ala and L-Ala-L-Ala by measuring their adsorption isotherms on a Teicoplanin-based CSP. The study and characterization of mechanisms responsible for chiral recognition between amino acids and dipeptides in solution and chiral macrocyclic antibiotics can lead to important information to be exploited in the planning of new, more effective antibiotics or for the improvement of the efficacy of the already existing ones.

THEORY

Binding Models. The simplest model for binding events involves the interaction of one ligand with one single class of receptor binding sites. A given receptor molecule may have multiple, equivalent sites, but the model assumes their independence. This basic model goes by various names depending on the field of application. Chromatographers, for instance, recognize it as the Langmuir binding isotherm,^{18–21} for biochemists, this is

a form of the Michaelis–Menten model.²² The demonstration of the correspondence between the Langmuir isotherm and the Michaelis–Menten equation is given in the Supporting Information. In literature, the model has been referred to also as “single-site immobilized ligand only interacting with the solute”.^{18,19,23} All equations stem from an equilibrium mass action treatment of the simple equilibrium:



where A represents the solute binding to ligand sites L on the particles. The equation describes an equilibrium involving interactions of the solute with a single site on the immobilized ligand. No interactions between the solute and other sites on the ligand or competition for the adsorption by other molecules are accounted for. For this binding model, the equilibrium association constant (L/mol) is

$$K_L = \frac{[AL]}{[A][L]} \quad (2)$$

with the square brackets representing molar concentrations. The concentration of the bound solute, [AL], can be expressed as $\rho_p q_A$, being ρ_p the particle density (g/cm³ particle) and q_A the average concentration of sorbed A. The latter can be expressed either as moles per gram of adsorbent (mol/g) or moles per square meter of adsorbent (mol/m²). The concentration of the uncomplexed, active immobilized ligand [L], is the difference between the maximum number of accessible binding sites, $\rho_p q_s$ (q_s is the saturation capacity), and those that are occupied, $\rho_p (q_s - q_A)$. Finally, by indicating with c_A (mol/L) the concentration of A in liquid, from eq 1, at equilibrium, one gets the familiar Langmuir relationship:

$$q_A = \frac{q_s K_L c_A}{1 + K_L c_A} \quad (3)$$

which describes monolayer adsorption on energetically homogeneous solids.

Molecular models proposed to interpret the binding of amino acids and polypeptides in solution to macrocyclic antibiotics show that different types of interactions are involved. The antibiotic/substrate complex is stabilized through both its dispersive interactions, the electrostatic interactions, and, most importantly, through a series of hydrogen bonds.^{24–35} From a macroscopic

(15) Schriemer, D. C. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 441A–448A.

(16) Arnell, R.; Ferraz, N.; Fornstedt, T. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 1682–1689.

(17) Cavazzini, A.; Felinger, A.; Kaczmarek, K.; Szabelski, P.; Guiochon, G. *J. Chromatogr., A* **2002**, *953*, 55–66.

(18) Nichol, L. W.; Ogston, A. G.; Winzor, D. J.; Sawyer, W. H. *Biochem. J.* **1974**, *143*, 435–443.

(19) Dunn, B. M.; Chaiken, I. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1974**, *71*, 2382–2385.

(20) Dunn, B. M.; Chaiken, I. M. *Biochemistry* **1975**, *14*, 2343–2349.

(21) Hethcote, H. W.; Delisi, C. *J. Chromatogr.* **1982**, *248*, 183–202.

(22) Winzor, D. J.; Sawyer, W. H. *Quantitative Characterization of Ligand Binding*; Wiley-Liss: New York, 1995.

(23) Jaulmes, A.; Vidal-Madjar, C. *Adv. Chromatogr.* **1989**, *28*, 1–64.

(24) Williams, D. H. *Nat. Prod. Rep.* **1996**, *13*, 469–477.

(25) Williamson, M. P.; Williams, D. H.; Hammond, S. J. *Tetrahedron* **1984**, *40*, 569–577.

(26) Williams, D. H.; Searle, M. S.; Mackay, J. P.; Gerhard, U.; Maplestone, R. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1993**, *90*, 1172–1178.

(27) Lee, J. G.; Sagui, C.; Roland, C. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 8384–8385.

(28) Crowley, B. M.; Boger, D. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 2885–2892.

(29) Zavaleta, J.; Chinchilla, D.; Martinez, K.; Gomez, F. A. *J. Chromatogr., A* **2006**, *1105*, 59–65.

(30) Schmid, M. G.; Hölbling, M.; Schnedlitz, N.; Gübitz, G. *J. Biochem. Biophys. Methods* **2004**, *61*, 1–10.

(31) Scrimin, P.; Tecilla, P.; Tonellato, U.; Verzini, M.; Andreini, B. P.; Coutant, J. E.; Zerilli, L. F. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 6268–6272.

(32) Williams, D. H.; Bardsley, B. *Angew. Chem., Int. Ed.* **1999**, *38*, 1173–1193.

point of view, an important model to account for adsorption data in heterogeneous systems is the so-called Tóth isotherm.³⁶ There are obviously also other models employed to describe heterogeneous adsorption. Among these, the bi-Langmuir isotherm is most often used to describe separations on CSPs. In the bi-Langmuir model, the surface is considered paved exclusively by two different kinds of adsorption sites, which in case of CSPs, are identified with selective and nonselective ones. The adsorption energy distribution function is given by two Dirac's delta corresponding to the adsorption energy values for the two interactions. On the other hand, an heterogeneous adsorption model, such as the Tóth isotherm, that accounts for a wide distribution of adsorption energies (mapping a wide variety of interaction mechanisms) seems to be more realistic to describe a complex adsorption process involving multiple interactions, as in the case of molecular recognition by macrocyclic antibiotics. The Tóth isotherm is written as

$$q_A = \frac{q_s K_T c_A}{[1 + (K_T c_A)^r]^{1/r}} \quad (4)$$

where r is a heterogeneity parameter. This parameter can vary from zero to unity. If $r = 1$, the Tóth model corresponds to the Langmuir equation. In contrast to the Langmuir isotherm, for which K_L is an equilibrium constant, in the Tóth model the equilibrium constant is K_T .³⁷ Tóth et al.³⁸ found the energy distribution function, $F(\varepsilon)$, corresponding to eq 4 in the case of gas–solid adsorption. This is

$$F(\varepsilon) = \frac{1}{\pi k_B T} Y(\varepsilon)^{1/r} \sin\left[\frac{1}{r} \arcsin\left[\sin(\pi r) \frac{k}{k_m} Y(\varepsilon)\right]\right] \quad (5)$$

where k_B denotes the Boltzmann constant, T is the absolute temperature, and

$$Y(\varepsilon) = \sqrt{\left(\frac{k}{k_m}\right)^{2r} + 2 \cos(\pi r) \left(\frac{k}{k_m}\right)^r + 1} \quad (6)$$

In eqs 5 and 6, k is the equilibrium constant and ε the adsorption enthalpy. In gas–solid equilibria, ε and k can be related by the following expression:³⁹

$$k = k_0 \exp\left(\frac{\varepsilon}{RT}\right) \quad (7)$$

where k_0 is a preexponential factor (assumed constant at constant T). k_m is the equilibrium constant that corresponds

to the enthalpy value, ε_m , at which eq 5 assumes its maximum value:

$$k_m = k_0 \exp\left(\frac{\varepsilon_m}{RT}\right) \quad (8)$$

The heterogeneity parameter is related to the width of the adsorption energy distribution function (eq 5), the smaller r the wider the distribution function.

The extension of this model to liquid–solid interfaces requires to consider changes of free Gibbs adsorption energy, ΔG , instead of changes in adsorption enthalpy.^{40,41} In this case, the equilibrium constant can be related to the Gibbs adsorption energy by

$$k = \exp\left(-\frac{\Delta G}{RT}\right) \quad (9)$$

Determination of Binding Constants through Frontal

Analysis. FA is a powerful technique to characterize solute-sorbent interactions by determination of adsorption isotherms. The fundamental equation of FA stems from an integral mass balance throughout a column in equilibrium with a given mobile phase composition.⁴² The attainment of equilibrium is evidenced by an abrupt change in the concentration profile (breakthrough curve). From the breakthrough volume, V_b , the amount adsorbed q_A (mol/g), corresponding to the mobile phase concentration c_A (mol/L), is calculated by

$$q_A = \frac{(V_b - V_0)c_A}{w_{\text{pack}}} \quad (10)$$

where w_{pack} is the weight (g) of packing inside the column and V_0 the hold-up volume. From eqs 3 and 10 one obtains the expression traditionally used in binding studies to relate FA experiments to the association constant.⁴³

$$V_b - V_0 = \frac{q_s K_L w_{\text{pack}}}{1 + K_L c_A} \quad (11)$$

Equation 11 can also be written in terms of dissociation constant K_D (mol/L)^{15,44} by recalling that K_D is the reciprocal of K_L .

In case the Tóth isotherm is used for the interpretation of binding data, analogous considerations lead to the following expression relating empirical FA measurements and thermodynamic properties

$$V_b - V_0 = \frac{q_s K_T w_{\text{pack}}}{[1 + (K_T c_A)^r]^{1/r}} \quad (12)$$

EXPERIMENTAL SECTION

Column and Chemicals. To reduce the amount of material needed for isotherm determination a microbore column (150 ×

(33) Westwell, M. S.; Gerhard, U.; Williams, D. H. *J. Antibiot.* **1995**, *48*, 1292–1298.

(34) Barna, J. C. J.; Williams, D. H.; Williamson, M. P. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1985**, *5*, 254–256.

(35) Perkins, H. R. *Biochem. J.* **1969**, *111*, 195–205.

(36) Tóth, J. *Acta Chim. Hung.* **1962**, *31*, 393–405.

(37) Felinger, A.; Cavazzini, A.; Guiochon, G. *J. Chromatogr., A* **2003**, *986*, 207–225.

(38) Tóth, J.; Rudziński, W.; Waksmundzki, A.; Jaroniec, M.; Sokolowski, S. *Acta Chim. Hung.* **1974**, *82*, 11–20.

(39) de Boer, J. H. *The Dynamical Character of Adsorption*; Clarendon Press: Oxford, 1968.

(40) Cavazzini, A.; Kaczmarek, K.; Szabelski, P.; Zhou, D. M.; Liu, X. D.; Guiochon, G. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 5704–5715.

(41) Felinger, A.; Zhou, D. M.; Guiochon, G. *J. Chromatogr., A* **2003**, *1005*, 35–49.

(42) Guiochon, G.; Felinger, A.; Shirazi, D. G.; Katti, A. *Fundamentals of preparative and nonlinear chromatography*, 2nd ed.; Elsevier Academic Press: Amsterdam, 2006.

(43) Arnold, F. H.; Schofield, S. A.; Blanch, H. W. *J. Chromatogr.* **1986**, *355*, 1–12.

(44) Chaiken, I. M. *J. Chromatogr.* **1984**, *376*, 11–32.

Table 1. Column and Packing Material Properties

particle size (μm)	5
pore diameter (\AA)	100
V_0 (mL) ^a	0.807
surface area (m^2/g) ^b	455
packing mass (g) ^c	0.73
μmoles Teicoplanin/ g packing	146.0
μmoles Teicoplanin/ g silica	242.9
μmoles Teicoplanin/ m^2	0.53
V_i (mL) ^d	0.307
V_{sp} (mL/ g) ^e	0.369

^a From pycnometry measurements. ^b Unbounded silica. ^c Inside the column. ^d From ISEC measurements. ^e Specific Pore Volume (volume of pores per gram of adsorbent).

3.2 mm stainless steel) home-packed with Teicoplanin bound to silica particles (5 μm diameter, 100 \AA average pore diameter, 455 m^2/g surface area; Daisogel, Daiso, Osaka, Japan) was employed. Principal characteristics of column and packing material are listed in Table 1.

The mobile phase was 60:40 v/v methanol/buffer 20 mM ammonium acetate in water (pH 7.0). Methanol and ammonium acetate were purchased by Fluka-Riedel de Haën (Buchs, Switzerland). Milli-Q water (Millipore, MA, U.S.A.) was used. Buffer solutions were filtered before use with 0.22 μm pore size membrane (Durapore GVWP04700, Millipore, Bedford, MA, U.S.A.).

Alanine (D- and L-Ala), Proline (D- and L-Pro), D-alanine-D-alanine (D-Ala-D-Ala), and L-alanine-L-alanine (L-Ala-L-Ala), (3-aminopropyl)-triethoxysilane, 1-(trimethylsilyl)-imidazole, 1,6-diisocyanatohexane, triethylamine (TEA) were purchased by Sigma (Steinheim, Germany). Tetrahydrofuran (THF), dichloromethane (CH_2Cl_2), toluene, methanol (MeOH), acetonitrile (ACN), dry toluene, dry pyridine, dry dimethylsulfoxide (dry-DMSO) were also purchased from Sigma.

Polystyrene (PS) standards (500, 1000, 2000, 2500, 5000, 9000, 17 500, 20 000, 34 500, 50 000, 110 000, 200 000, 402 000, 655 000, 1030 000, 1570 000, 2000 000, 2700 000, 3040 000 Dalton) were from Supelco (Bellefonte, PA, U.S.A.).

Instrument. A micro HPLC (Agilent 1100 micro series, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, U.S.A.) equipped with a microdiode array detector (500 nl) was used. Silica tubing (internal diameter 150 μm , Upchurch, Oak Harbor, WA, U.S.A.) were employed to reduce the extra-column volume.¹⁷ Isotherm measurements were performed at 500 $\mu\text{L}/\text{min}$ flow rate. Amino acids and dipeptides were detected at 214 nm. The column was thermostatted at 25.0 ± 0.1 $^\circ\text{C}$. The temperature was controlled by a digital thermometer (2176A Fluke) placed inside the Peltier unit.

FA Measurements. FA was performed by using the available multichannel solvent delivery system. One channel was used to deliver the sample solution and the other to pump the pure mobile phase. Both solvent streams are mixed in the mixing chamber. The column was reequilibrated with pure mobile phase after each injection. The total range of concentration investigated was between 0.01–10 g/L for Ala and Ala-Ala and 0.01–20 g/L for Pro. Twenty data points were acquired in the range 0.01–1 g/L, 5 points between 1–2 g/L and, finally, 10 points in the range 2–10 g/L for Ala and Ala-Ala and 2–20 g/L for Pro.

Upper concentration values were in some cases dictated by solubility constraints. For instance, Ala-Ala solubility was empiri-

cally found to be slightly larger than 12 g/L in the mobile phase used in this work. Expressed as molar fraction (by assuming ideal solution behavior) this is as low as 0.002. This is important with respect to the choice of a proper adsorption model (adsorption from diluted solutions), as will be discussed further on.

Hold-up Volume Determination. The determination of the hold-up volume, V_0 , by means of an unretained compound is problematic with Teicoplanin-based CSP because of the difficulty of finding adequate markers for this material.¹² In this work, V_0 was determined through pycnometry. The technique consists in weighing the chromatographic column, filled with liquids of different densities,^{45,46} and calculating V_0 as

$$V_0 = \frac{w_{\text{CH}_2\text{Cl}_2} - w_{\text{THF}}}{\rho_{\text{CH}_2\text{Cl}_2} - \rho_{\text{THF}}} \quad (13)$$

where ρ and w indicate density and weight, respectively. V_0 was found to be 0.807 ± 0.005 mL (average of six weightings). The stationary phase volume was $V_s = 0.399$ mL, the total porosity $\epsilon_t = 0.667$, and the phase ratio $F = 0.49$.

Stationary Phase Preparation and Characterization. The improved version of CSP-Teicoplanin was prepared by three different steps starting from very high surface area (455 m^2/g) silica with respect to the previous version of Teicoplanin-based CSP having 340 m^2/g .^{7,11} The employ of this new matrix provided higher loading of chiral selector. Simultaneously, the efficient end-capping produced a decrease of non-specific interactions mainly given by residual silanol groups. The column and packing material properties are summarized in Table 1.

Preparation of the (3-Aminopropyl)-Functionalized Silica-Gel, (3-APSG). A slurry of 3.0 g of silica (Daisogel Si 100–5 μm , surface area 455 m^2/g) in 75 mL of toluene was heated to reflux, and residual water was azeotropically removed. After cooling to room temperature, (3-aminopropyl)-triethoxysilane was added (1.80 mL, $\text{C}_9\text{H}_{23}\text{O}_3\text{NSi}$, M_w : 221.37, d: 0.94) and the mixture was heated to reflux for 4 h. Modified silica (3-APSG) was isolated by filtration, washed with toluene, methanol, dichloromethane, and dried at reduced pressure (70 $^\circ\text{C}$, 0.1 mbar, 1 h). Elemental analysis: C 4.25%, H 1.32%, N 1.54%; the coverage of aminopropyl groups, calculated from averaged values of nitrogen and carbon, provides 1259 $\mu\text{mol}/\text{g}$ or 2.77 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ of silica (corresponding to 1139 $\mu\text{mol}/\text{g}$ of matrix). FT-IR (KBr): 2978, 2936, 1599, 1071, 804 cm^{-1} .

End-Capping of 3-Aminopropyl Silica Gel (3-APSG-sil). Amino-propyl silica (3-APSG, 3.0 g) was added to a solution of 1-(trimethylsilyl)-imidazole (1.80 mL, $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_2\text{Si}$, M_w : 140.26, d: 0.96) in toluene (60 mL). The mixture was mechanically stirred and heated to reflux for 4 h. After cooling to room temperature, modified 3-APSG-sil was isolated by filtration, washed with toluene, methanol, methanol/TEA 99/1, methanol, dichloromethane, and dried at reduced pressure (70 $^\circ\text{C}$, 0.1 mbar). Elemental analysis: C 6.50%, H 1.67%, N 1.45%. FT-IR (KBr): 2959, 2932, 1595, 1085, 801 cm^{-1} .

Preparation of CSP-Teicoplanin. The reaction was carried out in a lab-modified rotary evaporator. Mechanical stirring was

(45) Rustamov, I.; Farcas, T.; Ahmed, F.; Chan, F.; LoBrutto, R.; McNair, H. M.; Kazakevich, Y. V. *J. Chromatogr., A* **2001**, *913*, 49–63.

(46) Gritti, F.; Kazakevich, Y.; Guiochon, G. *J. Chromatogr., A* **2007**, *1161*, 157–169.

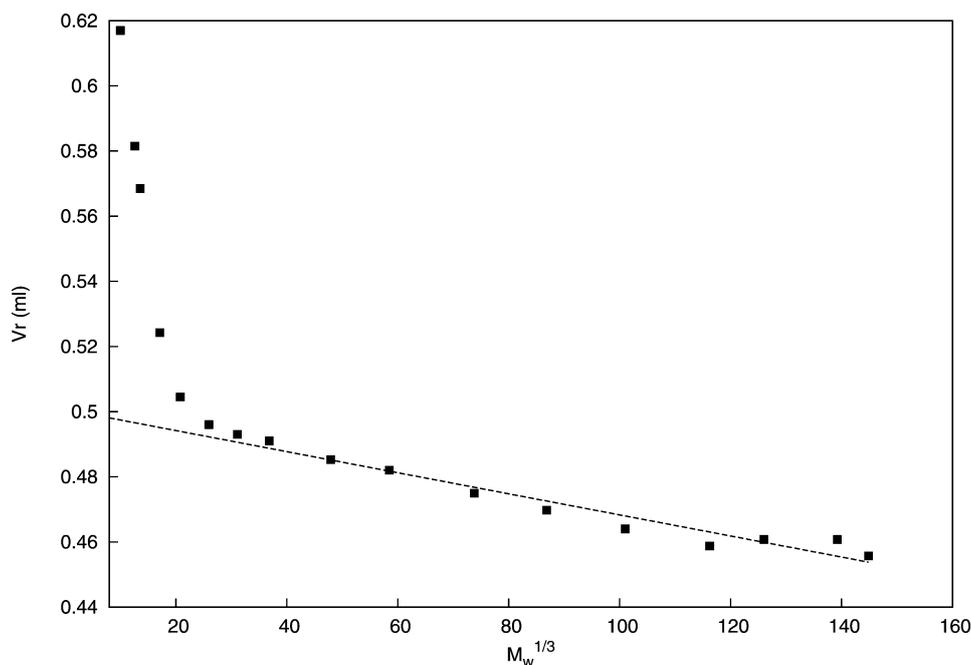


Figure 1. Plot of PS elution volumes vs the cubic root of their molecular weight.

obtained by spinning the reaction flask around its axis while reactant solutions were added under argon pressure. 1,6-Diisocyanatohexane (2.5 mL, $C_8H_{12}N_2O_2$, M_w 168.20, d: 1.04) was added to an ice-bath cooled slurry of the 3-APSG-sil in dry toluene (3.0 g in 40 mL), and the mixture was heated to 70 °C for 2 h under argon atmosphere and mechanical stirring. After cooling to room temperature, the liquid phase was removed by suction/filtration through an immersion sintered Teflon filter, and the intermediate spacer silica-gel was washed twice with dry toluene (2×20 mL). A solution of Teicoplanin in dry pyridine/DMSO 5/2, v/v (1.52 g in 35 mL) was added, and the mixture was heated to 70 °C for 12 h, with continuous stirring. The antibiotic Teicoplanin (Teicoplanin_{A2-2}, $C_{88}H_{97}Cl_2N_9O_3$, M_w 1877.56) was vacuum-dried before use (0.1 mbar, 1 h, at 70 °C). The stationary phase (CSP-Teicoplanin) was isolated by filtration and washed with 50 mL portions of pyridine, water, methanol, acetonitrile, and dichloromethane, and dried under reduced pressure (70 °C, 0.1 mbar). Weight increase: 30%, elemental analysis: % C 19.36, % H 2.76; % N 3.53 corresponding to 243 and $0.53 \mu\text{mol}/\text{m}^2$ of silica ($146 \mu\text{g}$ of matrix). The coverage was calculated from averaged values of nitrogen and carbon. FT-IR (KBr): 2934, 2866, 1644, 1566, 1089, 795 cm^{-1}

The efficiency (20000 N/m) of new CSP-Teicoplanin column (150×3.2 mm ID) was checked by injection of achiral test mixture (benzene, toluene, biphenyl, naphthalene) in reversed-phase conditions while its enantioselective performances were determined by analysis of free amino acids conventional elution mode. Internal, ϵ_i , and external, ϵ_e , porosities were determined by inverse size exclusion chromatography (ISEC). Samples of polystyrene of known average molecular weight and narrow molecular weight distributions were injected into the column equilibrated with THF. The plot of PS elution volumes versus the cubic root of their molecular mass allows for the estimation of external, V_e , and internal, V_i volumes. The ISEC estimate of

V_e is derived from the extrapolation to $M_w = 0$ of the linear regression calculated for the volumes of the totally excluded PS samples ($V_e = 0.500$ mL). This is represented in Figure 1. V_i is given by the difference between V_0 and V_e ($V_i = 0.307$ mL). From these data, one obtains $\epsilon_e = 0.417$ and $\epsilon_i = 0.255$.

RESULTS AND DISCUSSION

The interpretation of adsorption at the liquid–solid interface by means of expressions such as eqs 3 and 4, in which adsorbed amounts are identified with the number of moles of analyte adsorbed per unit weight of the solid, is very frequent in liquid chromatography even though it contrasts to the competitive nature of the liquid–solid adsorption. Since there are not vacancies in the surface solution and the bulk solution, in fact, the number of molecules of a given component in the surface phase may increase only by displacing an equivalent number of molecules of other components from this phase to the bulk phase. However, when adsorption is from dilute solutions and the solute is preferentially adsorbed on the solid with respect to the other mobile phase components,⁴⁷ eqs 3 and 4 may prove to be approximately valid. These conditions appear to be reasonably applicable to our work. It is out of doubt that, for all the investigated cases, solutions of peptides and amino acids were very diluted (see Experimental Section). The assumption that amino acids and dipeptides can be considered the only species able to adsorb on the solid requires more caution. There is much experimental evidence showing that the chromatographic behavior (selectivity, efficiency, etc.) of Teicoplanin- and, more generally, of macrocyclic antibiotic-based CSPs, is strongly affected by the surrounding chemical environment.^{8,11–14,48} These findings indicate that mobile phase constituents play an important role in the chiral recognition process, even if the way they compete or influence the adsorption of analytes

(47) Schay, G. Adsorption of solutions of nonelectrolytes. In *Surface and Colloid Science*; Matijević, E., Ed.; Wiley-Interscience: New York, 1969; Vol. 2.

(48) Armstrong, D. W.; Rundlett, K. L.; Chen, J. R. *Chirality* **1994**, *6*, 496–509.

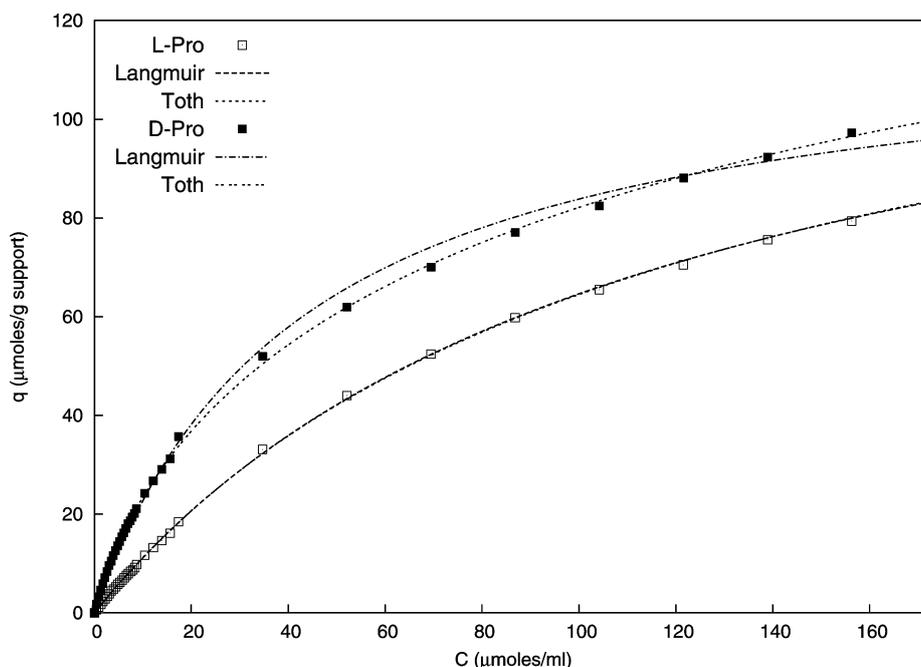


Figure 2. D-Pro, L-Pro adsorption isotherms. Points: experimental data for L-Pro (empty squares) and D-Pro (filled squares). Lines: best fitting isotherms for the Langmuir and the Tóth models (see figure key for details). For D-Pro, the best Langmuir and Tóth isotherms overlap.

on the CSP has not been completely elucidated. To understand the origin of these phenomena, the determination of excess adsorption isotherms from ternary, quaternary, or even more complex mixtures, would be needed. Mobile phases typically employed with Teicoplanin-based CSP are, in fact, binary or ternary mixtures, buffered to a given pH and with defined ionic strength. A first attempt in this direction has been done by Poplewska et al.,^{49,50} who measured excess isotherms of commonly used mobile phase modifiers (in binary aqueous solutions) on a Teicoplanin-based CSP.

When the Langmuir isotherm (eq 3) is used for the interpretation of adsorption experiments, the assumption is made that the energies of all the possible interactions (selective and nonselective) between analytes and macrocyclic antibiotics are very close. Because of that, they can be averaged to one single adsorption energy, and one single binding constant can be defined which characterizes all the adsorption sites on the surface.⁴⁰ Figures 2–4 report the experimental points (squares) for the adsorption of the enantiomers of Pro, Ala, and Ala-Ala. In these plots, dashed-dotted lines represent the best fitting of data via the Langmuir isotherm. The isotherm parameters obtained by nonlinear fitting are listed in Table 2.

As it is evident from a visual comparison between data points and isotherm courses, the Langmuir model closely follows the experimental points for L-Pro, D-, L-Ala and L-Ala-L-Ala. For D-Pro and D-Ala-D-Ala (Figures 2 and 4), instead, this isotherm model does not fit the data in a satisfactory way. This means that an homogeneous adsorption model does not represent a realistic description of the binding process in these cases. On the contrary, the heterogeneous Tóth model (eq 4) fits the points fairly well (except for L-Ala, see later on) as demonstrated in Figures 2 and

4 where the dotted lines represent the best Tóth isotherms. Isotherm parameters for the Tóth model are reported in Table 2. Fitting of adsorption data for L-Ala with the Tóth model leads to a value of r greater than 1 (see Table 2), which has no physical meaning (in the Tóth model r has to be included in the range 0–1). The reason is that for L-Ala the isotherm curvature is almost zero and the use of a three-parameter model (the Tóth equation) is redundant.

A further clue of the different ability of the models to account for the experimental data of D-Pro and L-Ala-L-Ala comes from the estimation they give of the linear behavior of these compounds. The retention factors, k' , estimated by means of the Langmuir isotherm for D-Pro and L-Ala-L-Ala are far from those measured directly from chromatograms: in Table 3 the value of k' , calculated through isotherm parameters

$$k' = aF \quad (14)$$

where a is the slope of the isotherm at infinite dilution (Henry's constant of the adsorption), is compared with the value obtained by linear chromatograms through the traditional equation

$$k' = \frac{V_R - V_0}{V_0} \quad (15)$$

being V_R the linear retention volume. V_R was estimated through the method of moments,⁴² since asymmetrical peaks were observed even in linear conditions. This phenomenon known as kinetic tailing is originated by the heterogeneity of the adsorption surface.^{51,52} From the data listed in Table 3, one may observe that the retention factors of D-Pro and D-Ala-D-Ala are the largest among those of all the amino acids and the dipeptides

(49) Poplewska, I.; Kramarz, R.; Piatkowski, W.; Seidel-Morgenstern, A.; Antos, D. *J. Chromatogr., A* **2007**, *1173*, 58–70.

(50) Poplewska, I.; Kramarz, R.; Piatkowski, W.; Seidel-Morgenstern, A.; Antos, D. *J. Chromatogr., A* **2008**, *1192*, 130–138.

(51) Lin, B.; Ma, Z.; Golshan-Shirazi, S.; Guiochon, G. *Anal. Chem.* **1988**, *60*, 2647–2653.

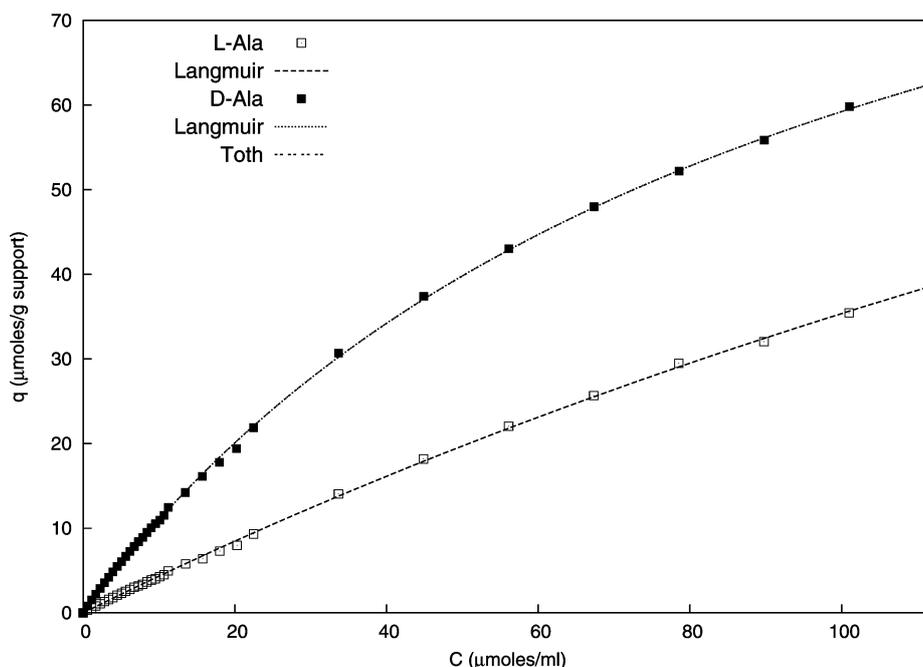


Figure 3. D-Ala, L-Ala adsorption isotherms. Points: experimental data for L-Ala (empty squares) and D-Ala (filled squares). Lines: best fitting isotherms for the Langmuir and the Tóth models (see figure key for details). For D-Ala, the Langmuir and the Tóth isotherms overlap. For L-Ala, only the Langmuir isotherm is represented because of the inability of the Tóth model to fit the experimental data (see Table 2).

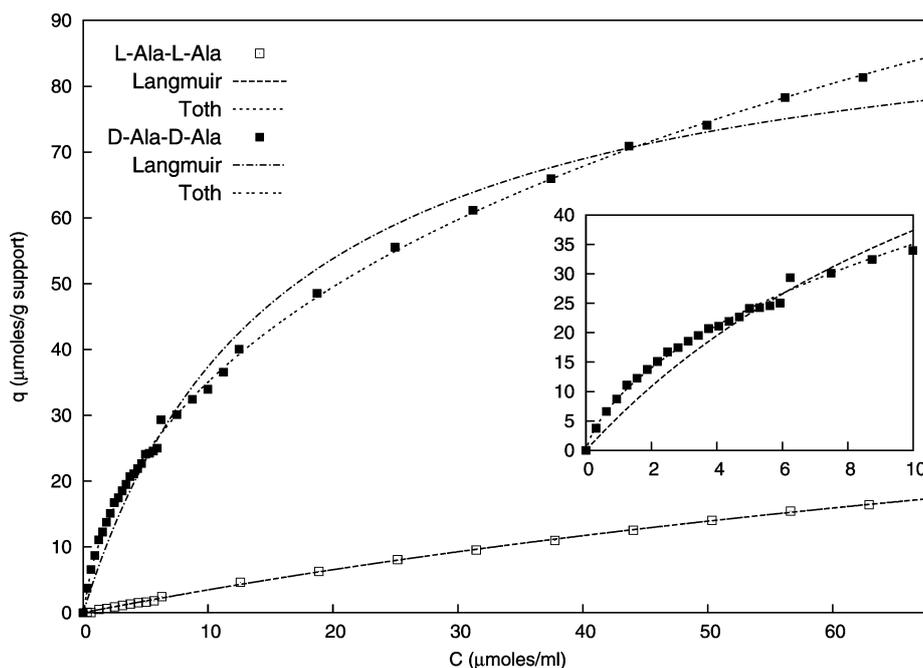


Figure 4. D-Ala-D-Ala, L-Ala-L-Ala adsorption isotherms. Points: experimental data for L-Ala-L-Ala (empty squares) and D-Ala-D-Ala (filled squares). Lines: best fitting isotherms for the Langmuir and the Tóth models (see figure key for details). For L-Ala-L-Ala, the Langmuir and the Tóth isotherms overlap. Inset: zoomed region for D-Ala-D-Ala adsorption at low mobile phase concentrations.

studied. Their estimates through the Langmuir model are totally incorrect because the Langmuir model is, for both cases, unable to fit the initial part of the isotherms.

On the other hand, estimations of k' by the Tóth model are very close to those calculated through linear chromatograms (eq 15) for all cases. Minor differences (1–2%) can be explained by the errors made in the numerical integration of peaks because of the influence of noise and baseline drift on the determination of the integration boundaries.

Compounds exhibiting low chromatographic retentions are characterized by adsorption isotherms with little curvature (since the equilibrium constant is small in these cases, see, for example, eq 3). Besides L-Ala, even L-Pro, D-Ala and L-Ala-L-Ala had k' smaller than one under the experimental conditions of this work (Table

(52) Cavazzini, A.; Remelli, M.; Dondi, F.; Felinger, A. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 3453–3462.

(53) Klein, D. B.; Blanot, D.; Gutmann, L.; van Heijenoort, J. *Biochem. J.* **1994**, *304*, 1021–1022.

Table 2. Best Isotherm Parameters through Non-Linear Fitting^a

compound	Langmuir			Tóth			
	q_s^b	K_L^c	SSR	q_s^b	K_T^c	r	SSR
D-Pro	119 ± 2	0.023 ± 0.001	3.617	204 ± 10	0.126 ± 0.009	0.55 ± 0.02	0.312
L-Pro	138 ± 1	0.0088 ± 0.0001	0.187	144 ± 6	0.011 ± 0.002	0.95 ± 0.04	0.187
D-Ala	115 ± 1	0.0105 ± 0.0001	0.078	117 ± 6	0.011 ± 0.002	0.98 ± 0.04	0.081
L-Ala	171 ± 7	0.0026 ± 0.0001	0.042	179 ± 7	0.005 ± 0.002	1.36 ± 0.18 ^d	0.037
D-Ala-D-Ala	96 ± 2	0.064 ± 0.004	7.072	656 ± 191	0.52 ± 0.04	0.25 ± 0.03	0.446
L-Ala-L-Ala	56 ± 3	0.0066 ± 0.0004	0.022	65 ± 31	0.01 ± 0.01	0.91 ± 0.23	0.023

^a Parameter errors are expressed as standard deviation unless differently specified. SSR: variance of residuals (reduced Chi-Square). ^b $\mu\text{mol/g}$ packing. ^c $\text{mL}/\mu\text{mol}$. ^d Without imposing any constraints on the parameters of the Tóth model, data fitting invariably leads to $r = 1.36$, which has no physical meaning (r has to be in the range 0–1). This means that the Tóth model is not suitable to describe the data in this case. See text for further details.

Table 3. k'_{chrom} , k'_L , and k'_T Retention Factors Calculated from the Chromatograms (eq 15), the Langmuir Model, and the Tóth Model (eq 14), Respectively^a

compound	k'_{chrom}	k'_L	α_L	k'_T	α_T
D-Pro	2.3	1.34	2	2.29	3.8
L-Pro	0.6	0.59		0.60	
D-Ala	0.6	0.59	3	0.59	
L-Ala	0.2	0.22		b	
D-Ala-D-Ala	23.8	3.03	17	23.5	119
L-Ala-L-Ala	0.2	0.18		0.19	

^a α_L , α_T : separation factors calculated by k' 's estimated through the Langmuir and the Tóth models, respectively. Mobile Phase: 60/40 v/v methanol:buffer 20 mM ammonium acetate in water (pH = 7). ^b See note *d* in Table 2.

3). A simple visual inspection of the adsorption data corresponding to these cases (Figures 2, 3, and 4) suggests that there are not significant differences between Langmuir and Tóth isotherms (for L-Ala, for the reasons discussed before, the Tóth model was not adequate to fit the data). In particular, for L-Ala-L-Ala ($k' \approx 0.2$), the isotherm curvature appears to be almost zero. As it happened with L-Ala, the use of the 3-parameter Tóth model seems to be redundant.

To give a more precise meaning to the significance of the isotherm parameters in the different cases a statistical analysis is needed. Usually, model selection is based on the minimization of the square of the residual error sum (SSR, see Table 2) between experimental data and fitting function. As a rule of thumb, the larger the number of parameters of a model the greater the ability of the model to fit the experimental data. An increase of the number of parameters enhances the ability of the model “to getting close” to the experimental data and minimize the residuals. In the case herein considered, it is thus obvious that a model selection based solely on residual error minimization would invariably lead to the three-parameter Tóth isotherm since it includes (for $r = 1$) the two-parameter Langmuir model. The question is whether the heterogeneity parameter is (statistically) significant or not. To answer this question a Student's *t*-test has to be used to examine the significance of the r parameter with respect to one ($r = 1$ is the Langmuir model). The 95% confidence interval for r is given by

$$r \pm t_{0.025, n-p} \times s_r \quad (16)$$

where s_r is the standard deviation of r (see Table 2) and $t_{0.025, n-p}$ is the tabulated Student's *t* value at 0.025 of significance and $n - p$ degree of freedom (n is the number of data and p the number of estimated parameters, $p = 3$ for the Tóth model). It can be observed, from the data of Table 2, that for all but D-Pro and D-Ala-D-Ala cases, the 95% confidence intervals include $r = 1$ ($t_{0.025, 30} = 2.042$). Consequently, for these cases, the Langmuir model has to be chosen, while the Tóth isotherm better fits for D-Pro and D-Ala-D-Ala. These findings have been further confirmed by a lack of fit (LOF) test. This is an approximated F-test that compares the sum of the square of the distance of the group mean from the regression line (Sum of Square due to the Lack Of Fit, SSLOF) to the variance due to experimental uncertainty (SSPE). LOF-test was performed by using three replicates for each measurement. By using the Langmuir equation, the LOF was significant only for D-Pro and D-Ala-D-Ala. For these cases, the Tóth equation was instead found to be acceptable. The results of *t*- and LOF-test are in strict agreement. Both indicate the Langmuir isotherm to be the best model for all but D-Pro and D-Ala-D-Ala cases, for which the Tóth equation outperforms.

From the adsorption data (Table 2), one observes the binding constant for the dipeptide D-Ala-D-Ala is the largest among all the considered compounds: 0.52 $\text{mL}/\mu\text{mol}$, which is more than four times the constant of D-Pro (0.126) and even 50 times larger than that of L-Ala-L-Ala (0.01). This is in agreement with molecular models indicating the D-Ala-D-Ala group as the target of this class of antibiotics.^{2,3,24,26} In particular, it is worthy to observe that the separation factor α (i.e., the ratio between the retention factors of the more and the less retained enantiomers) for the dipeptide Ala-Ala is much larger (≈ 120 , data reported in Table 3) than for the other peptides considered in this study. This indicates that CSP-Teicoplanin behaves very much as a molecular filter for the enantiomers of the dipeptide.

The surprisingly large value of α observed for Ala-Ala must be contextualized within the framework of this work. Adsorption isotherm studies in fact give an idea of global (apparent) constants, which strictly depend on the actual experimental conditions. To the best of our knowledge, there are no published works that investigated the separation of L-Ala-L-Ala from D-Ala-D-Ala on Teicoplanin CSP through nonlinear liquid chromatography. On the other hand, there are many findings (obtained not only by chromatography) of the extremely large binding between Teico-

(54) Corti, A.; Ruralli, C.; Borghi, A.; Cassani, G. *Clin. Chem.* **1985**, *31*, 1606–1610.

planin or Teicoplanin-like molecules and derivatized dipeptides (e.g., refs 29, 30, and 53).

An important point to be considered in the comparison of adsorption data achieved by chromatographic or chromatographic-like techniques regards the manner in which retention was calculated. It is well-known that, with macrocyclic antibiotics, the peak of the more retained enantiomer is often characterized by strong asymmetry. Especially if retention is very large, the evaluation of the first moment of the analyte peak (needed for the calculation of k') can be difficult because of an unfavorable signal-to-noise ratio. Estimation of k' through peak maximum, on the other hand, is poorly accurate in such cases. It is relevant to note that if the parameters of the Langmuir isotherm (which accounts for an homogeneous adsorption and predicts symmetrical peaks under linear conditions⁵²) were used for the estimation of α , a value of 16.8 would be obtained for the dipeptide (see Table 3). This is about seven times smaller than that calculated with the Tóth model but consistent with values published in literature for the separation of dipeptides on Teicoplanin aglycone CSPs.³⁰

From the data reported in Table 2, q_s estimation for D-Ala-D-Ala is about 650 $\mu\text{mol/g}$ packing. By considering that the surface concentration of Teicoplanin was found to be 146 $\mu\text{mol/g}$ packing (see Table 1), one would get to the conclusion that, per one molecule of antibiotic bound to the support, there would be four molecules of D-Ala-D-Ala. This result contrasts with 1/1 binding models described in literature for the interaction between D-Ala-D-Ala residue and macrocyclic antibiotics.²⁴ Analogous considerations lead for D-Pro, L-Pro and D-Ala to ratios of 1.2, 0.9, and 0.7, respectively. L-Ala and L-Ala-L-Ala were excluded by these calculations inasmuch as q_s value is untrustworthy in these cases because of the very low curvature of the isotherms. Molecular studies into the mechanisms of action of glycopeptide antibiotics, giving evidence of 1/1 association between Teicoplanin and D-Ala-D-Ala, have been principally carried out through solution NMR experiments.^{24,25} In this work, estimation of the 4/1 association ratio was obtained by the interpretation of nonlinear chromatographic data. Some basic differences between solution NMR and chromatographic studies can justify this finding. First of all, solvents used for dissolving Teicoplanin and the dipeptide for solution NMR experiments are significantly different from mobile phases employed in the chromatographic measurements. It has been demonstrated that surrounding environment (namely, pH, ionic strength, etc.) has a dramatic effect on the binding ability of the antibiotic to substrates. In addition, in solution NMR, Teicoplanin molecules are dissolved in the liquid solution, while they are bound to the surface in Teicoplanin-based

CSPs. This can originate spatial modifications of the macrocyclic antibiotic structure and/or, possibly, induce association between adsorbed Teicoplanin molecules to create aggregates of Teicoplanin, with consequences on the association ratio. In literature, there are other data suggesting the existence of association ratio different than 1/1. For instance, Ruruli et al.⁵⁴ developed a solid-phase enzyme receptor assay for glycopeptide antibiotics Teicoplanin. Even though in that case a terminal $\sim\text{D-Ala-D-Ala}$ was immobilized to a plastic surface and the antibiotic was in solution, "the number of binding sites per molecule [...] was found to be 6.8".⁵⁴

Finally, as it was previously said, the conclusion that 4 molecules of D-dipeptide binds to one selector Teicoplanin comes from the interpretation of experimental chromatographic data, namely, the ratio of the dipeptide maximum loading (saturation capacity) over the moles of Teicoplanin present on the support. Saturation capacity is calculated from adsorption data by an extrapolation at very large mobile phase concentrations, and this can introduce bias in the estimation of the association ratio.

CONCLUSIONS

This study shows that correct interpretation of binding of amino acids and dipeptides to Teicoplanin requires adsorption data collected in a wide concentration range. Neglecting this aspect may lead to inaccurate conclusions regarding the nature of the adsorption phenomenon. In particular, a heterogeneous adsorption process could be misleadingly modeled as an apparent homogeneous one.

Adsorption data reveal that the antibiotic macrocyclic Teicoplanin behaves as a molecular filter, at receptorial level, toward the enantiomers of the dipeptide tested in this study. This is demonstrated by the extraordinary binding constant between Teicoplanin and D-Ala-D-Ala that leads to an extremely large chromatographic separation factor between the enantiomers of the dipeptide.

ACKNOWLEDGMENT

This work has been supported by the Italian University and Scientific Research Ministry (CHEM-PROFARMA-NET, RBPR05NWWC_008) and by the University of Ferrara (FAR-2008).

SUPPORTING INFORMATION AVAILABLE

Additional information as noted in the text. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

Received for review April 1, 2009. Accepted July 8, 2009.

AC900677F

Automated instrumental method for on-line fraction analysis and peak deconvolution in gradient multicomponent overloaded high performance liquid chromatography

Valentina Costa, Luisa Pasti, Nicola Marchetti, Francesco Dondi, and
Alberto Cavazzini *

Department of Chemistry, University of Ferrara
Via L. Borsari 46, 44100 Ferrara, Italy

Abstract

An automated method for deconvolution of overloaded band profiles in gradient elution is described. The instrumental set-up consists of a pseudo-bidimensional HPLC system, where overloaded band profiles generated in the first direction are sampled on the second one. The method, previously employed under isocratic conditions, has been now extended to gradient elution, where one has to face the problem of band compression (and possibly band interference) during gradient, which decreases the time-window available along the first direction for sampling the overloaded profiles. The effect of the gradient steepness on the problem of defining a minimum number of sampling points to reconstruct single component bands from overloaded profiles is investigated. In the framework of the problem of isotherm determination to model preparative gradient elution, this approach is important especially when Inverse Method (IM) is used for the scope. In fact, it allows for the gathering of the information necessary to run IM calculations with minimum afford, also in cases where the individual component forming the mixture have different UV spectra.

*Corresponding author; email: cvz@unife.it. Fax:+39.0532.240709

1 Introduction

In gradient elution, the eluotropic strength of the mobile phase is progressively increased during the separation. As a result, the band tail always moves in a mobile phase that is slightly stronger than the mobile phase at the front of the band; the band tail therefore tends to move faster than the band front. The resulting narrowing of the band is referred to as gradient compression, which partially counteracts the band broadening during migration through the column [1–4]. While analyses made in gradient elution often involve the use of small and dilute samples, the column is often overloaded in preparative gradient chromatography. This causes the adsorption isotherm to be nonlinear and competitive. In addition, interference effects become important. [5].

In gradient elution the high-concentration part of the isotherm influences the band profiles more than in isocratic chromatography. The importance of an accurate equilibrium isotherm is much higher for a correct simulation of profiles obtained in gradient elution than for those provided by isocratic elution, because in the latter case, the bands dilute steadily during their migration while in the former case they concentrate. This has been demonstrated by El Fallah and Guiochon [6] and by Antia and Horváth [7] who calculated the band profiles of single component and binary mixtures in nonlinear preparative liquid chromatography. In these calculation, they assumed the classical one-dimensional differential mass balance equation, a linear gradient and a competitive Langmuir adsorption model in which the isotherm coefficients are functions of the mobile phase composition, namely:

$$q_i(\Phi, C_i) = \frac{a_i(\Phi)C_i}{1 + \sum_{j=1}^n b_j(\Phi)C_j} \quad (1)$$

where i and j range over the number of components, q and C represent the stationary and mobile phase concentrations, respectively, a is the Henry constant of the adsorption, b the equilibrium adsorption constant and, finally, Φ the fraction of the modifier (strong solvent) in the mobile phase. There have been few other

comparative studies of calculated and experimental band profiles in gradient elution [6, 8, 9]. These studies have illustrated the need for accurate modeling of the equilibrium isotherm under widely varying conditions, to know how the isotherm parameters change during the gradient due to changes in the mobile phase composition (see Eq. 1).

Among the different techniques available to measure adsorption isotherms by chromatography, so-called inverse methods (IM) [10–12] allow for significant reduction of time, material and thus costs. By means of these numerical techniques, in fact, isotherms are calculated by few chromatograms recorded under overloaded conditions, without the need of equilibrating the column at successive increasing analyte concentrations, as it is typically required, for instance, by frontal analysis or perturbation on the plateau techniques [5]. IM calculations are run after transformation of the chromatographic response (most often a UV signal) to concentration units. In simple cases, such as for the elution of single component or racemic mixtures (since the enantiomers have the same UV spectra), this can be done through mass balance considerations [13], based on the fact that the amount injected into the column has to correspond to the amount eluted (provided no chemical reaction of analytes is happening). In more complex situations, it is necessary to measure calibration curves for each component of the mixture at one or possibly multiple wavelengths. These are long and expensive procedures requiring considerable amounts of pure components. To overpass these drawbacks, different expedients have been proposed, which essentially exploit the linear range of the UV spectrum [12]. Lately, a very elegant approach that does not require the calibration of the UV signal has been developed [14].

This paper discusses the extension to the case of preparative gradient elution of an instrumental method of peak deconvolution for multicomponent-overloaded high performance liquid chromatography previously developed under isocratic conditions [15]. Method accuracy has been evaluated by calculating mass recovery.

2 Experimental

Fig. 1 shows the scheme of the bidimensional system employed in this work. The system is made by two chromatographic lines (in this work also referred to as directions): the first is composed by pump-1, injector-1 and column-1. Direction-2 includes pump-2, column-2, detector-2 and the data acquisition-system. There are two operational positions: position-1, loading (upper part of Fig. 1), and position-2, injecting (lower part of Fig. 1). A 10-port two-position switching valve controlled by software switches between one position and the other (even though a 6-way two-position valve software-controlled could have been used without loss of system functionality).

2.1 Materials

Pump-1 was a 515 Waters pump for HPLC (Waters, USA); injector-1 was a 7725i Rheodyne valve (Rheodyne, Cotati, USA); detector-1 was an UV-DAD Agilent 1100; pump-2 was an Agilent 1100 pump (Agilent, Walbronn, Germany); detector-2 was an UV-DAD Agilent 1100 series photodiode array and the data acquisition system was Agilent Chemstation (V.A09.01). The commercial software used to control the 10-port 2-way valve (Rheodyne EV700-102 stainless steel) was LOGO! Soft Comfort V5.0 (Siemens).

Column-1 was 4.6×150 mm, C18-packed, particle diameter (d_p) 5 μm (Symmetry 300, Waters, MA, USA). Column-2 was 4.6×50 mm, C8-packed, $d_p=5\mu\text{m}$ (XTerraMS, Waters, MA, USA). The hold-up volume for the columns (measured through uracil injection) were approximately 1.77 and 0.83 ml, respectively. Benzyl alcohol (BzAl) was from Lab. BDH Reagent (Poole, England) and Phenol (Phe) from Carlo Erba (Milan, Italy). Water was Milli-Q water (Millipore, MA, USA); acetonitrile (ACN), HPLC grade, was purchased from Sigma Aldrich (Steinheim, Germany). Solvents were filtered before use (Nylon 66 membranes, 0.45 μm , Supelco, Bellefonte, PA, USA).

Low flow rates (0.1 mL/min) were employed along direction-1, where injection

of large volumes (loading position) of high-concentrated solutions was performed through loops of 100 μL (Loop-1 in Fig 1). The automatic sampling was performed through loop-2, 20 μL , at time interval Δt (see Discussion for details). In injecting position, the content of loop-2 is injected into the short column (column-2), operated at high flow rate (3 ml/min), and recorded at detector. For a more detailed description of the experimental set-up, readers are addressed to Ref. [15]. Detector was calibrated at 250 nm for both Phe and BzAl. Linear regression coefficients (R^2) larger than 0.999 were obtained (for 0–0.8 g/L concentrations).

3 Theory

According to Beer's law, absorbance (abs) is directly proportional to concentration (C):

$$abs = kC \quad (2)$$

being k the proportionality constant. If absorbance units are generically defined as AU and C is in g/L then, dimensionally, k is $\text{AU} \times \text{L} \times \text{g}^{-1}$. Under the assumption of Beer's law validity, the mass (m) of a peak eluted from a chromatographic column can be expressed as:

$$m = \int \frac{abs(V) dV}{k} \quad (3)$$

where $abs(V)$ is the chromatographic peak (in AU) as a function of the retention volume V (i.e., the product between the flow rate and the retention time). With reference to Fig. 1, division of Eq. 3 by $V_{\text{loop-2}}$ (the amount m is contained in this volume) gives the concentration (g/L) corresponding to the overloaded band profile sampled at a given time $n\Delta t$ (n ranging from 1 to the last sampled point n_n):

$$C(n\Delta t) = \frac{\int \frac{abs(V) dV}{k}}{V_{\text{loop-2}}} \quad n = 1, \dots, n_n \quad (4)$$

Eq. 4 allows for the conversion to concentration units of overloaded band profiles (column-1) from linear pulses recorded at detector-2.

In practice, deconvolution of multicomponent overloaded chromatograms to get the band profiles of individual species needs two conditions to be fulfilled.

First, along column-2, the components of the mixture have to be enough separated to permit the correct integration of respective chromatographic bands (see Eq.4). Once column-2 has been chosen, this condition practically limits the choice of the pair mobile phase composition/flow rate to well defined values. In chromatography, the resolution between adjacent bands is given by [16]:

$$R_s = \frac{\Delta t_R}{4\sigma} \quad (5)$$

where Δt_R indicated the difference between the retention times of the second and the first eluted component and σ is the averaged standard deviation.

The second condition is along direction-1. Here, a dense sampling of overloaded multi-component signal is important to have a sufficiently large number of points to reconstruct overloaded single-component chromatograms. The choice of the minimum sampling time (Δt_{min}) to which operate the switching valve is constrained by the relationship [15]:

$$\Delta t_{min} = 2\Delta t_R = 8\sigma R_s \quad R_s \geq 1 \quad (6)$$

where σ is the averaged standard deviation of peaks separated along column-2 and Δt_R is the different between the retention times of the last and first eluted components which guarantee a given resolution on column-2. Eq. 6 comes from the fact that, in two subsequent sampling injections, the last peak of the foregoing injection does not overlap the first peak of the next injection. The choice of Δt_{min} is critical especially in gradient elution with steep gradients since gradient compression reduces the time window available for sampling band profiles.

In the framework of the widely used theory known as linear solvent strength (LSS), the parameter used to define any gradient program is the gradient steepness (b_s), which is directly proportional to the change $\Delta\phi$ of the concentration of the strong solvent contained in mobile phase from the start to the end of the gra-

dient elution and inversely proportional to the gradient time t_G in which $\Delta\phi$ was applied:

$$b_s = \frac{t_0 S \Delta\phi}{t_G} \quad (7)$$

where t_0 is the hold-up time and S the slope of the (linear) relationship correlating $\log k'$ to the concentration ϕ [17, 18].

4 Discussion

Figure 2 shows the effect of the gradient on the preparative separation of a binary mixture of BzAl (first eluted peak) and Phe (second eluted compound). The flow rate was kept constant. The dashed line represents the chromatogram under isocratic conditions ($\phi=0.2$; solution composition: BzAl/Phe=6.8/15 g/L; injection volume: 100 μ L). The continuous line represents the gradient elution of the same mixture when the gradient steepness was 0.4. Calculation of b_s is straightforward from the data reported in Table 1 (column-1) and Eq. 7. An averaged value for S equal to 2.1 was used (S was 2.2 for Phe and 2.0 for BzAl). As it is evident from the figure, the net effect of the gradient is to compress the band profiles of both components. This significantly reduces the time window available for sampling the overloaded profile (from more than 20 min in isocratic case to less than 10 min for this particular gradient). Incidentally, the overlapping between bands is also increased in gradient elution. The compression generated by the gradient is obviously proportional to b_s , the larger b_s the stronger the effect [3]. Band width compression in gradient has direct consequences on the feasibility of the instrumental deconvolution of overloaded profile, since the minimum sampling time is constrained by existence of Eq. 6. Table 1 (column-2) reports the retention times and chromatographic resolution in function of ϕ measured on column-2. As it is evident from this table, for the specific column used in this work along direction-2, the only reasonable mobile phase composition was 20% ACN in water for which $R_s = 1.13$ (and $\sigma = 0.03$ min). Accordingly, by Eq. 6, $\Delta t_{min} \geq 0.24$ min. The risk,

when working with steep gradients, is to have not enough concentration/time points from the overloaded profile to reconstruct the single component peaks.

In this work, five different gradient programs were used, as detailed in Table 2, with a maximum $b_s = 1$. Figures 3 through 5 show the results of overloaded band profile sampling to get single component bands from convoluted profiles. Three solutions of different compositions were used and, for each composition, three different gradient programs were applied. The upper part of these figures represent the chromatograms (continuous lines) recorded at detector-2 (see Figure 1) when the system is operated to sample nonlinear peaks coming out from column-1. For Figures 3 and 4, in addition, the “overall” overloaded experimental band profile has been represented (dotted line) for one of the given gradient program. These signals were recorded by placing a detector downstream column-1 (as shown in Figure 1, position 1). They have been shown here exclusively for the sake of clarity, as they are not necessary to reconstruct the profiles of single components (Eq. 4). Lower parts of Figures 3–5 show how single component peaks look like after sampling. Note that both the x- and y-axis have been scaled by multiplication by flow rate and k^{-1} (Eq. 2), respectively.

Depending on the gradient program (Table 2) and minimum sampling time, the number of sampled data points varies sensibly. For instance, for b_s around 0.2, the sampling is very dense throughout the all profile. This is shown in Figure 5 for gradient 4 and 5 (see Table 2). In these cases, single component peaks are reconstructed on a large number of data points (ranging between 10-20 for the first eluted component and 20-30 for the second). Mass balance considerations – based on the comparison between masses calculated (calc) by integration of reconstructed signals and injected (inj) masses – show that the deconvolution is significantly accurate with high-density sampling, with relative percentage errors smaller than 3% (see Table 2). In all cases, interpolation by cubic spline functions [19] was performed before integration of single component peaks.

On the other hand, working with steeper gradients reduces the sampling window available and, consequently, the number of data points usable for calcula-

tion. For instance, in Figs. 3 and 4, gradient overloaded separations for $b_s = 0.65$ and 1 are shown (two different concentrations were considered). The number of sampled points for the first eluted component reduces to no more than 6-7 for $b_s = 0.65$ and to 4-5 when $b_s = 1$. Data reported in Table 2 show that also in cases where the sampling was critical and the signal smoothed, recovered masses (calc) are sufficiently in agreement with true values (inj), errors being no larger than 8-10%. Experimentally, these sampling densities represent the lowest possible values to reconstruct with a certain accuracy the single component peaks. For secondly eluted components, the situation was less unfavorable. In these cases, at least 10 data points were attained also with steep gradients. By considering in Figures 3 and 5 the cases corresponding to gradient 1 ($b_s = 0.4$), one sees that a larger system overloading plays an apparent positive role on the deconvolution process, as it allows for a better sampling especially of the fronts of overloaded bands (which are steeper at elevated loading [5]).

These results demonstrate the applicability of the instrumental approach to deconvolution of multicomponent preparative gradient separation. Our opinion is that the described method can be a helpful tool for chromatography practitioners involved with preparative gradient elution. Modeling of nonlinear gradient elution requires the knowledge of adsorption isotherms for a wide ensemble of mobile phase compositions. Possibly, the most important limitation to this is given by the availability of the pure substances needed for measuring multicomponent adsorption isotherm [5]. Experimental measurements, in addition, are tedious and time consuming. On the other hand, one single experiment on the pseudo-bidimensional system gives the information necessary to run IM calculation for a given gradient program, hence providing a simplification and optimization of experimental procedures.

5 Acknowledgments

This work has been supported by the Italian University and Scientific Research Ministry (CHEM-PROFARMA-NET, RBPR05NWWC_008).

References

- [1] U D Neue, D H Marchand, and L R Snyder. *J. Chromatogr. A*, 1111:32–39, 2006.
- [2] U D Neue. *J. Chromatogr. A*, 1079:153–161, 2005.
- [3] H Poppe, J Paanakker, and M Bronckhorst. *J. Chromatogr.*, 204:77–84, 1981.
- [4] F Gritti and G Guiochon. *J. Chromatogr. A*, 1178:79–91, 2008.
- [5] G Guiochon, A Felinger, D G Shirazi, and A M Katti. *Fundamentals of Preparative and Nonlinear Chromatography*. Academic Press, Elsevier, Second Edition, 2006.
- [6] M Z El Fallah and G Guiochon. *Anal. Chem.*, 63:2244–2252, 1991.
- [7] F D Antia and Cs Hórvath. *J. Chromatogr.*, 484:1–27, 1989.
- [8] N Marchetti, F Dondi, A Felinger, R Guerrini, S Salvadori, and A Cavazzini. *J. Chromatogr. A*, 1069:162–172, 2005.
- [9] A Damtew, B Sreedhar, and A Seidel-Morgenstern. *J. Chromatogr. A*, 1216:5355–5364, 2009.
- [10] A. Felinger, A. Cavazzini, and G. Guiochon. *J. Chromatogr. A*, 986:207–225, 2003.
- [11] R Arnell, P Fórssen, and T Fornstedt. *J. Chromatogr. A*, 1099:167–174, 2005.
- [12] P Fórssen, R Arnell, and T Fornstedt. *Comput. Chem. Eng.*, 30:1381–1391, 2006.
- [13] A Cavazzini, G Nadalini, V Malanchin, V Costa, F Dondi, and F Gasparri. *Anal. Chem.*, 79:3802–3809, 2007.
- [14] J Cornel, A Tarafder, S Katsuo, and M Mazzotti. *J. Chromatogr. A*. Available on the web, doi:10.1016/j.chroma.2010.01.063.
- [15] A Cavazzini, V Costa, G Nadalini, and F Dondi. *J. Chromatogr. A*, 1137:36–41, 2006.
- [16] A Felinger. *Data analysis and signal processing in chromatography*. Elsevier, Amsterdam, 1998.

- [17] L R Snyder, J W Dolan, and J R Gant. *J. Chromatogr.*, 165:3–30, 1979.
- [18] P Jandera. In P R Brown, E Grushka, and S Lunte (Eds.), editors, *Advances in chromatography*, volume 43, pages 1–107. M. Dekker, New York, NY, 2005.
- [19] W H Press, S A Teukolsky, W T Vetterling, and B P Flannery. *Numerical Recipes in Fortran, The Art of Scientific Computing*. Cambridge University Press, second edition edition, 1994.

6 Figure Captions

Figure 1. Scheme of the bidimensional instrumental set-up showing the loading and the sampling position

Figure 2. Effect of the gradient on the overloaded elution of a binary mixture of BzAl (first-) and Phe (second-eluted component). Single component concentrations (g/L): BzAl/Phe=6.8/15. Injection volume: 100 μ L. Flow rate: 0.1 mL/min. Column: column-1. Dashed line: isocratic elution ($\phi=0.2$); continuous line: gradient elution ($\phi=0.2-0.7$ in $t_g=50$ min, $b_s=0.4$). y-axis represents the UV signal recorded at 250 nm. Please note that, under these conditions, UV detector is strongly saturated.

Figure 3. Deconvolution of overloaded multicomponent peak and reconstruction of individual chromatograms for three different gradient programs (see Table 2 for details). Upper part: overloaded band profiles after sampling on direction-2 (continuous line). In one case, the overloaded band profile as detected at 250 nm (dashed line) is also represented. Lower part: single component peaks expressed as concentration vs. retention volume.

Figure 4. Same as Figure 3 but for a different binary solution concentration (see Table 2 for details).

Figure 5. Same as Figure 3 but for a different binary solution concentration and different gradient programs (see Table 2 for details).

ϕ	Column-1		Column-2		
	$k'(\text{BzAl})$	$k'(\text{Phe})$	$t_R(\text{BzAl})$	$t_R(\text{Phe})$	R_s
0.2	1.43	2.07	0.54	0.68	1.13
0.3	0.72	1.05	0.35	0.43	0.71
0.4	0.43	0.61	0.28	0.32	0.50
0.5	0.29	0.38	0.24	0.27	0.41
0.6	0.19	0.24	0.22	0.23	0.20
0.7	0.13	0.16	0.21	0.22	0.20

Table 1: Retention factors, k' , and retention times, t_R , as a function of the mobile phase composition (ϕ : ACN fraction), for column-1 and -2. On column-2, retention times were measured at 3 ml/min; corresponding chromatographic resolutions (Eq. 5) are also given. See text for details.

Fig. 3	BzAl/Phe=6.8/15								
	Grad 1			Grad 2			Grad 3		
	$\phi: 0.2-0.7, t_G=50$ $b_s=0.4$			$\phi: 0.2-0.7, t_G=30$ $b_s=0.65$			$\phi: 0.2-0.7, t_G=20$ $b_s=1$		
BzAl	inj	cal	err %	inj	cal	err %	inj	cal	err %
Phe	0.679	0.645	-5	0.679	0.658	-3	0.679	0.625	-8
	1.501	1.561	4	1.501	1.558	4	1.501	1.411	-6
Fig. 4	BzAl/Phe=6.8/20								
	Grad 1			Grad 2			Grad 3		
	$\phi: 0.2-0.7, t_G=50$ $b_s=0.4$			$\phi: 0.2-0.7, t_G=30$ $b_s=0.65$			$\phi: 0.2-0.7, t_G=20$ $b_s=1$		
BzAl	inj	cal	err %	inj	cal	err %	inj	cal	err %
Phe	0.679	0.670	1	0.679	0.636	6	0.679	0.660	3
	2.019	2.12	5	2.019	2.036	1	2.019	2.10	4
Fig. 5	BzAl/Phe=20.9/13.5								
	Grad 4			Grad 5			Grad 1		
	$\phi: 0.1-0.5, t_G=70$ $b_s=0.2$			$\phi: 0.2-0.5, t_G=50$ $b_s=0.2$			$\phi: 0.2-0.7, t_G=50$ $b_s=0.4$		
BzAl	inj	cal	err %	inj	cal	err %	inj	cal	err %
Phe	2.09	2.03	3	2.09	2.05	-2	2.09	2.13	2
	1.352	1.392	3	1.352	1.338	-1	1.352	1.379	2

Table 2: Comparison between injected (inj) and calculated (cal) masses (mg) for different binary solutions and gradient programs; err %: relative percentage error. Binary solution concentrations are given in g/L (BzAl/Phe= x/y). ϕ : ACN fraction; t_G gradient time (min); b_s gradient steepness (calculated according to Eq. 7); injection volume (Fig. 1, loop-1): 100 μ L; sampling volume (Fig. 1, loop-2): 20 μ L. See Experimental section for more details.

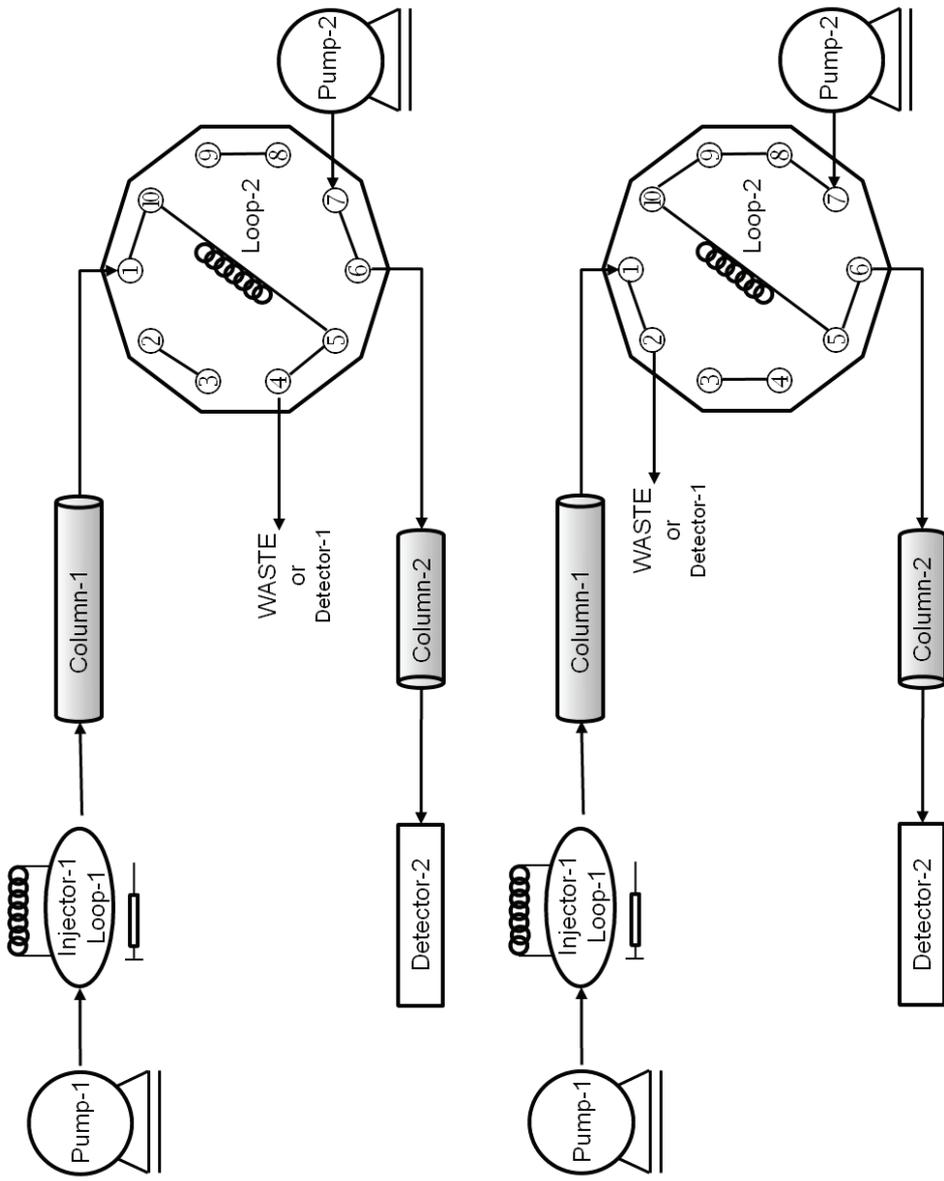


Figure 1:

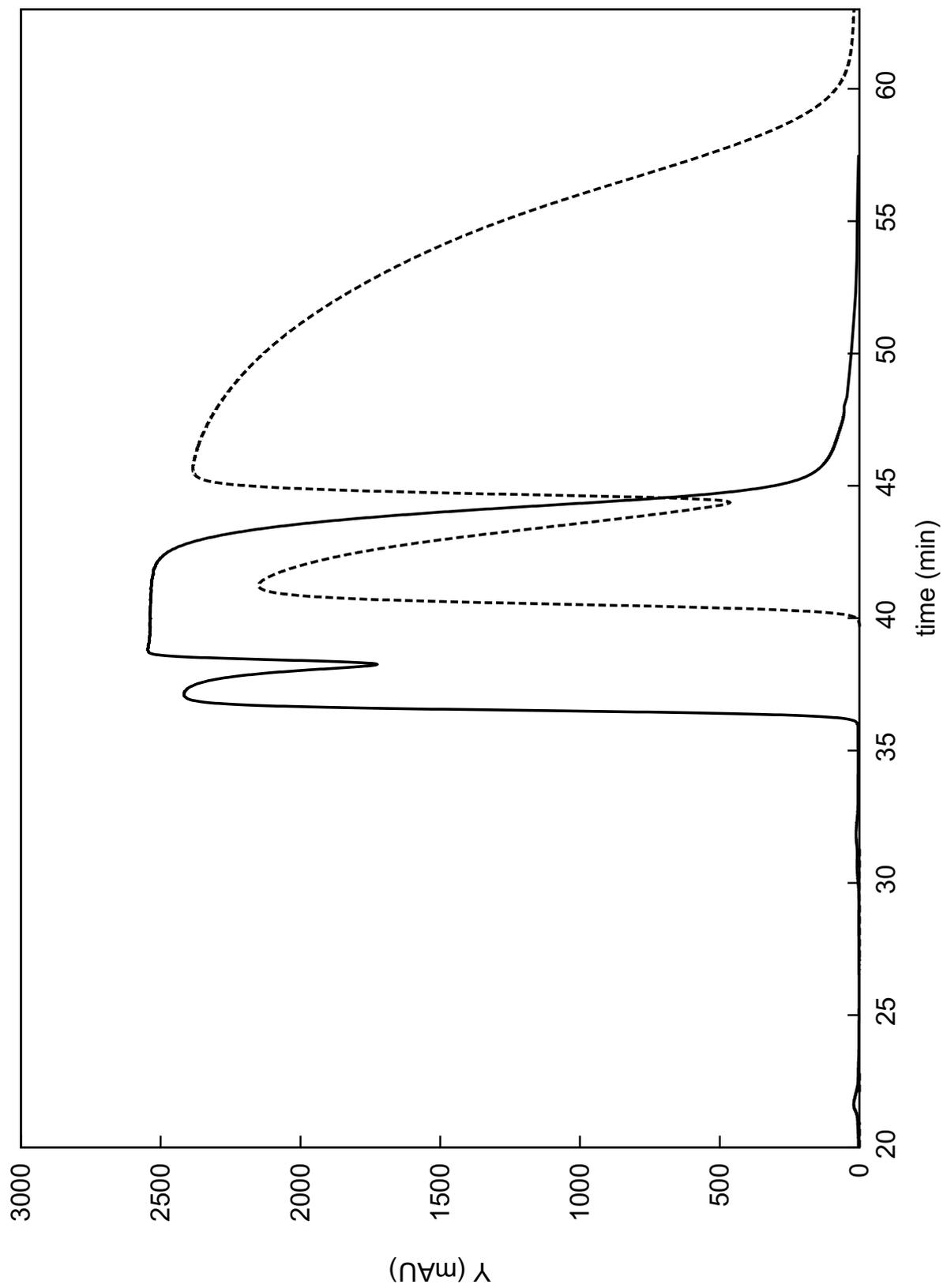


Figure 2:

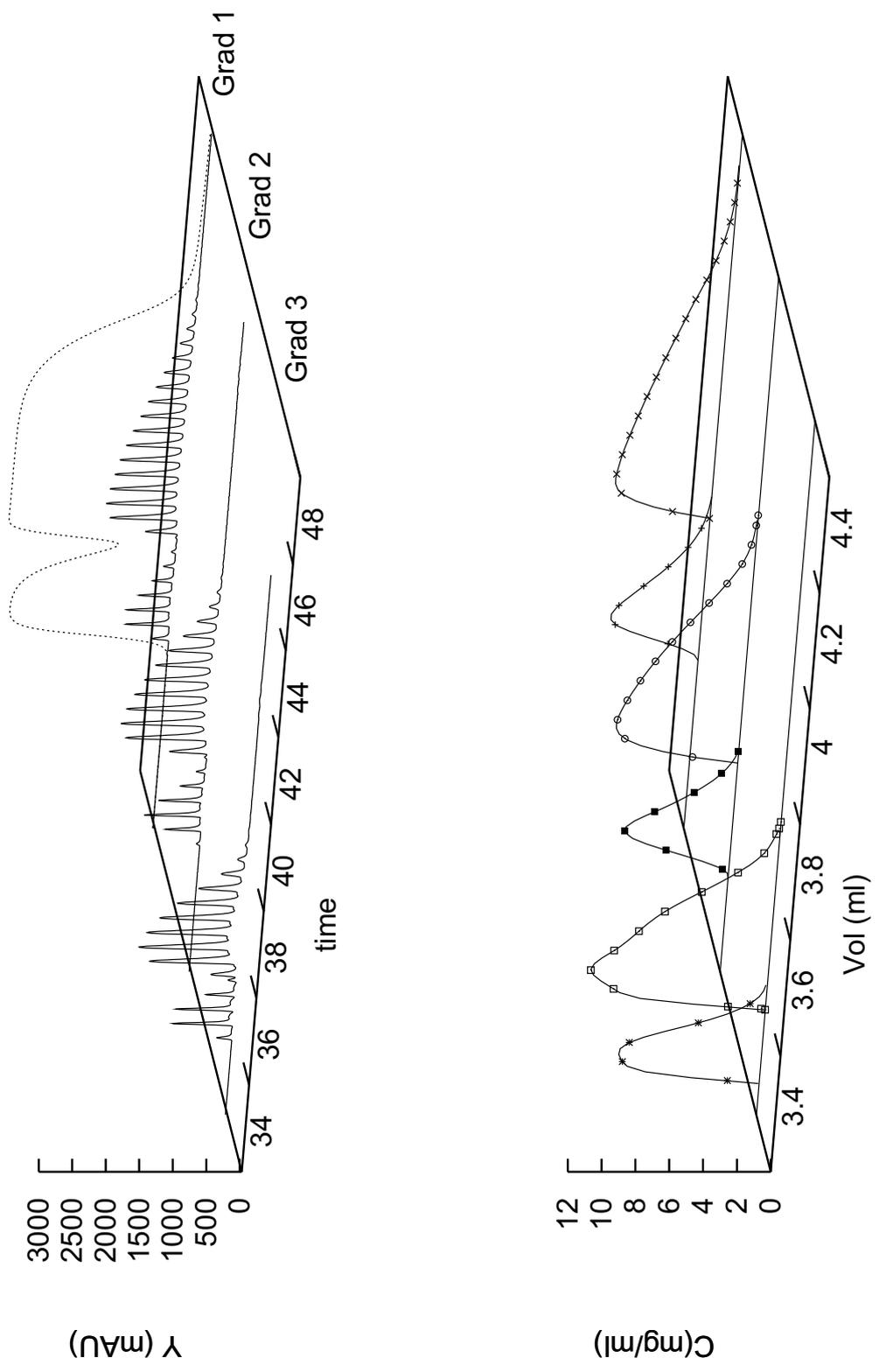


Figure 3:

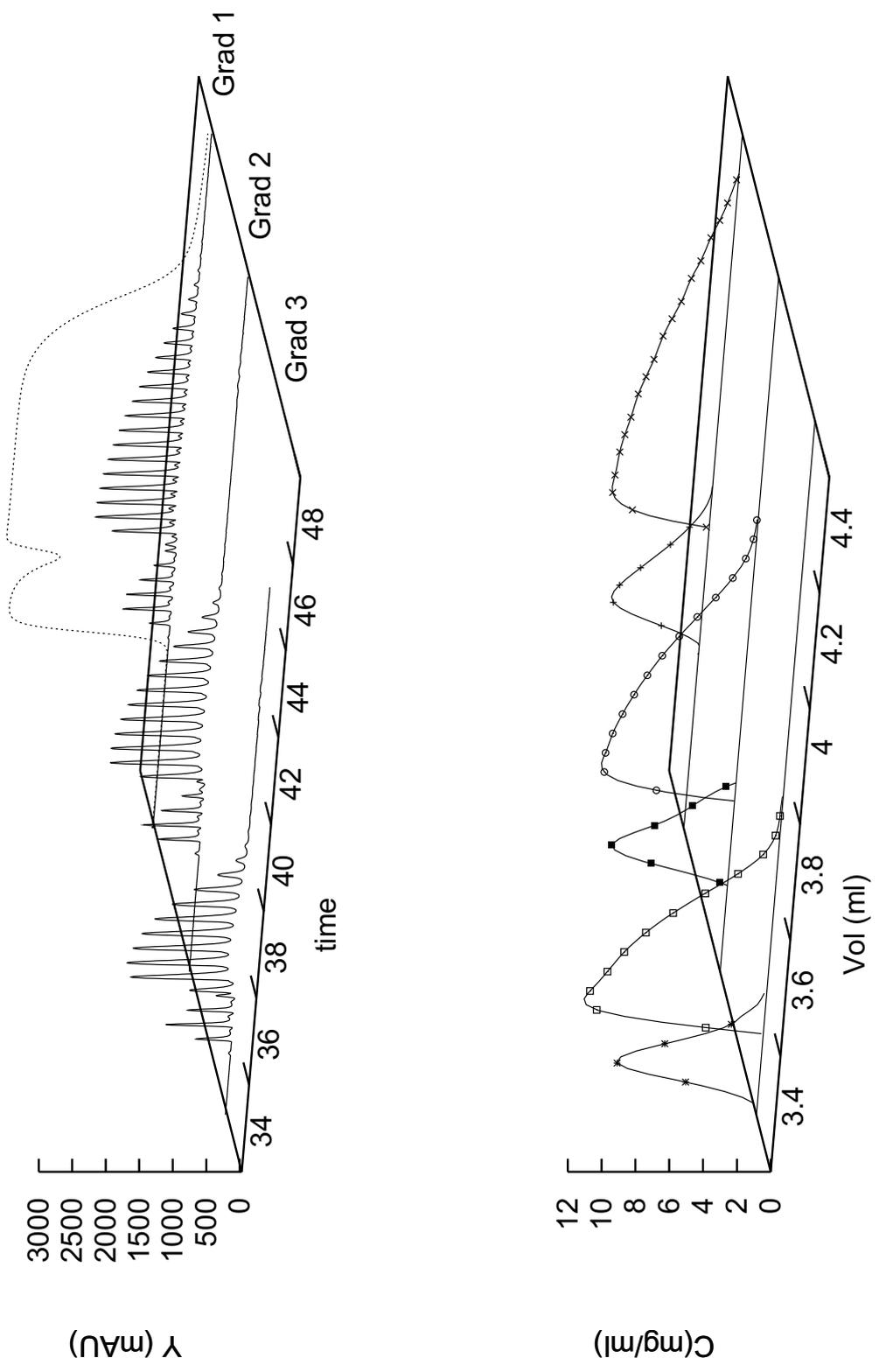


Figure 4:

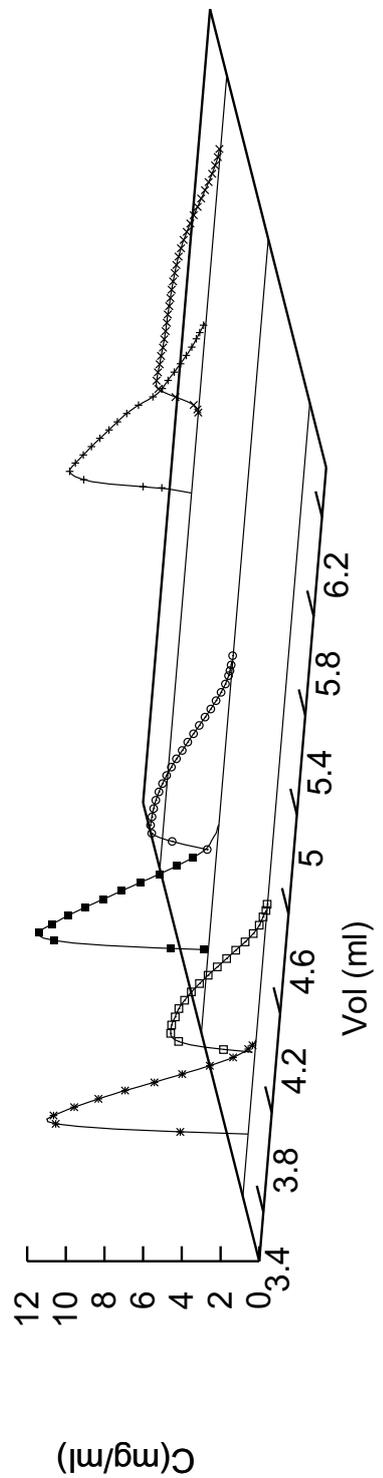
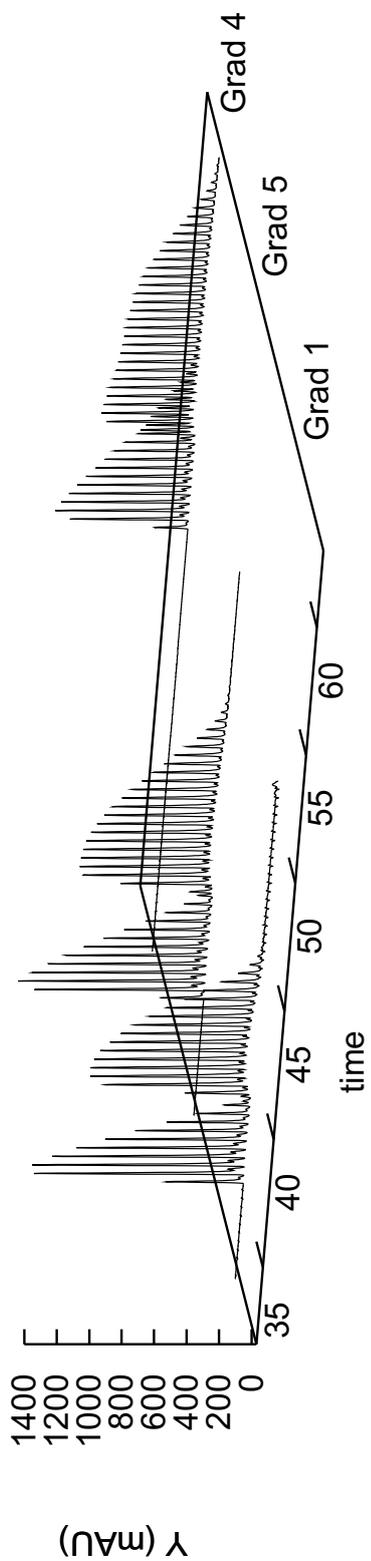


Figure 5:

Ringraziamenti

Desidero innanzitutto ringraziare il Dr.Cavazzini per i preziosi insegnamenti durante i tre anni di lavoro e le per le numerose ore dedicate alla mia tesi. Inoltre, ringrazio sentitamente il Prof. Dondi ed il gruppo di analitica che sono stati sempre disponibili a dirimere i miei dubbi durante la stesura di questo lavoro. Intendo poi ringraziare il Prof. Felinger e il Prof. Boos per la disponibilità per avermi permesso di trascorrere un periodo all'estero sereno ed edificante. Inoltre, vorrei esprimere la mia sincera gratitudine a Mattia ed agli altri dottorandi, in particolare Giulia, Dimitri, Marianna e Michele per i numerosi consigli durante la ricerca. Infine, ho desiderio di ringraziare con affetto i miei genitori per il sostegno ed il grande aiuto che mi hanno dato e tutte le persone che mi sono state vicine durante questo periodo.



Registrazione modulo Dichiarazione di conformità

MODULO INVIATO CORRETTAMENTE

Consegnare la copia stampata e debitamente firmata all'Ufficio Dottorato e Alta Formazione in via Scienze 41b Ferrara

Io sottoscritto Dott. (Cognome e Nome)

Costa Valentina

nato a

Agordo

Provincia

Belluno

il giorno

21/05/1981

Your E-Mail Address

valentina.costa@unife.it

avendo frequentato il corso di Dottorato di Ricerca in:

Scienze Chimiche

Ciclo di Dottorato

XXII

Titolo della tesi in Italiano

METODOLOGIE CROMATOGRAFICHE NELLO STUDIO DEI PROCESSI DI ADSORBIMENTO

Titolo della tesi in Inglese

STUDY OF LIQUID-SOLID ADSORPTION PROCESSES THROUGH CHROMATOGRAPHIC METHODS

Titolo della tesi in altra Lingua Straniera

Tutore - Prof:

Cavazzini Alberto

Settore Scientifico Disciplinare (SSD)

CHIM/01

Parole chiave (max 10)

Caratterizzazione processo adsorbimento, metodi nonlineari, isoterme, efficienza, cromatografia affinità, gradiente

Consapevole - Dichiaro

CONSAPEVOLE --- 1) del fatto che in caso di dichiarazioni mendaci, oltre alle sanzioni previste dal codice penale e dalle Leggi speciali per l'ipotesi di falsità in atti ed uso di atti falsi, decade fin dall'inizio e senza necessità di alcuna formalità dai benefici conseguenti al provvedimento emanato sulla base di tali dichiarazioni; -- 2) dell'obbligo per l'Università di provvedere al deposito di legge

delle tesi di dottorato al fine di assicurarne la conservazione e la consultabilità da parte di terzi; -- 3) della procedura adottata dall'Università di Ferrara ove si richiede che la tesi sia consegnata dal dottorando in 4 copie di cui una in formato cartaceo e tre in formato .pdf, non modificabile su idonei supporti (CD-ROM, DVD) secondo le istruzioni pubblicate sul sito :

<http://www.unife.it/dottorati/dottorati.htm> alla voce ESAME FINALE – disposizioni e modulistica; -- 4) del fatto che l'Università sulla base dei dati forniti, archiverà e renderà consultabile in rete il testo completo della tesi di dottorato di cui alla presente dichiarazione attraverso l'Archivio istituzionale ad accesso aperto "EPRINTS.unife.it" oltre che attraverso i Cataloghi delle Biblioteche Nazionali Centrali di Roma e Firenze. --- DICHIARO SOTTO LA MIA RESPONSABILITA' --- 1) che la copia della tesi depositata presso l'Università di Ferrara in formato cartaceo, è del tutto identica a quelle presentate in formato elettronico (CD-ROM, DVD), a quelle da inviare ai Commissari di esame finale e alla copia che produrrò in seduta d'esame finale. Di conseguenza va esclusa qualsiasi responsabilità dell'Ateneo stesso per quanto riguarda eventuali errori, imprecisioni o omissioni nei contenuti della tesi; -- 2) di prendere atto che la tesi in formato cartaceo è l'unica alla quale farà riferimento l'Università per rilasciare, a mia richiesta, la dichiarazione di conformità di eventuali copie; -- 3) che il contenuto e l'organizzazione della tesi è opera originale da me realizzata e non compromette in alcun modo i diritti di terzi, ivi compresi quelli relativi alla sicurezza dei dati personali; che pertanto l'Università è in ogni caso esente da responsabilità di qualsivoglia natura civile, amministrativa o penale e sarà da me tenuta indenne da qualsiasi richiesta o rivendicazione da parte di terzi; -- 4) che la tesi di dottorato non è il risultato di attività rientranti nella normativa sulla proprietà industriale, non è stata prodotta nell'ambito di progetti finanziati da soggetti pubblici o privati con vincoli alla divulgazione dei risultati, non è oggetto di eventuali registrazioni di tipo brevettale o di tutela. --- PER ACCETTAZIONE DI QUANTO SOPRA RIPORTATO

Firma Dottorando

Ferrara, lì _____

Firma del Dottorando _____

Firma Tutore

Visto: Il Tutore

Si approva

Firma del Tutore _____

FORMAZIONE POSTLAUREA

Ufficio Dottorato di Ricerca - Ufficio Alta Formazione ed Esami di Stato - IUSS
